



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIGÉNIOS  
DE *Fasciola gigantica* E SUA AVALIAÇÃO NO  
IMUNODIAGNÓSTICO DE FASCIIOLOSE**

**ANTÓNIO PINTO ALMEIDA**

**LISBOA**

**2011**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIGÉNIOS DE**  
***Fasciola gigantica* E SUA AVALIAÇÃO NO**  
**IMUNODIAGNÓSTICO DE FASCIIOLOSE**

**ANTÓNIO PINTO ALMEIDA**

*Tese apresentada para a obtenção do grau de*  
*Mestre em Parasitologia Médica, pela Universidade*  
*Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina*  
*Tropical*

**ORIENTADORA:**

**PROF<sup>a</sup> DOUTORA MARIA AMÉLIA AFONSO GRÁCIO**

**CO-ORIENTADORA:**

**PROF<sup>a</sup> DOUTORA SILVANA BELO**

**LISBOA**

**2011**

*“ De tudo ficaram três coisas: A CERTEZA de que estava sempre  
começando...A CERTEZA de que é preciso continuar...  
A CERTEZA de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Portanto devemos fazer...Da interrupção um caminho novo...  
Da queda um passo de dança...Do medo uma escada...  
Do sonho uma ponte...Da procura... um ENCONTRO.”*

(Fernando Sabino)

*Aos meus pais  
por se terem doado por inteiro, renunciando aos seus  
sonhos para que eu pudesse realizar os meus e pela  
constante confiança no futuro!*



## **Agradecimentos**

Este trabalho só foi possível graças à colaboração de todas as pessoas de minha convivência durante este período de crescimento e de amadurecimento. Manifesto a minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À minha orientadora Professora Doutora Maria Amélia Afonso Grácio, pelos ensinamentos, confiança e apoio na orientação deste trabalho;

À minha co-orientadora Professora Doutora Silvana Belo, por ter ajudado desde o início na planificação, realização das técnicas, apoio e disponibilidade científica;

À técnica Isabel Clemente, pela disponibilidade nos ensinamentos e apoio na execução das técnicas;

À Teresa dos Santos e aos Mestres Cátia Ferreira, Silvia Beato e Pedro Ferreira pelo apoio;

Ao pessoal da Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas em geral, que directa ou indirectamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado;

Ao colega Dr. Eduardo Oliveira, pelo apoio com algumas das fotografias presentes neste trabalho;

Aos meus colegas do IX Curso de Mestrado em Parasitologia Médica, pelo incentivo e pelos momentos partilhados desde o início desta jornada, pela parceria em todos os momentos bons e difíceis desta longa caminhada em que nos apoiamos e ajudamos uns aos outros;

Ao pessoal dos matadouros dos Concelhos da Praia e Assomada, na ilha de Santiago, CV;

Aos meus irmãos, Felisbela Almeida, São Pinto, Kiki Pinto e Luís Pinto, pelas palavras de estímulo em todos os momentos;

À Osvaldina Gonçalves, pelo apoio, paciência e encorajamento;

Aos meus tios, António Ramiro Lopes Pinto e Maria Antónia Soares Pinto, pelo apoio dispensado durante esses dois anos de estudo e, por terem estado sempre ao meu lado com compreensão e paciência.



## Resumo

O diagnóstico da fasciolose é feito principalmente por métodos serológicos, devido ao polimorfismo do quadro clínico e à baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos. Contudo, estes métodos apresentam algumas limitações, pelo que a melhoria dos testes imunológicos, nomeadamente, a utilização de antígeno homólogo, pode ser um factor relevante para a especificidade do diagnóstico.

Este estudo teve como objectivo a produção e avaliação de antígenos total e deslipidizado de *F. gigantica* no imunodiagnóstico da fasciolose pelos métodos de Micro-ELISA e Western-blot, em comparação com os de *F. hepatica*.

Foram analisados 111 soros de indivíduos cabo-verdianos e 67 de indivíduos residentes em Portugal, de ambos os sexos, com suspeita clínica de fasciolose. Os antígenos, total e deslipidizado, foram produzidos a partir de vermes adultos de *F. gigantica* recolhidos de bovinos na ilha de Santiago (Cabo Verde).

Os antígenos totais das duas espécies de *Fasciola* apresentaram a mesma sensibilidade (100%), mas a especificidade foi superior para o antígeno total de *F. gigantica* (95,2%), na detecção de IgG. À semelhança dos antígenos totais, os deslipidizados demonstraram uma sensibilidade de 100%. Contudo, a especificidade foi superior (95,2%) quando se utilizou o antígeno deslipidizado de *F. hepatica* em relação à obtida com *F. gigantica*, cujo valor foi de 90,5%. Quanto à detecção de IgM anti-*Fasciola*, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 97% e 90,5%, respectivamente, para os antígenos totais dos dois parasitas. Na pesquisa de IgM anti-parasita, as sensibilidades foram 94% e 83% para os antígenos deslipidizados de *F. gigantica* e *F. hepatica*, respectivamente, com uma especificidade de 90,5% para ambos os antígenos deslipidizados.

No *Immunoblotting*, a fracção antigénica de 24 kDa foi comum nas quatro preparações antigénicas, quer para IgM quer para IgG anti-*Fasciola*, pelo que a sua caracterização poderá ser



relevante para o desenvolvimento de métodos com maior especificidade e reprodutibilidade, melhorando significativamente o diagnóstico. A banda de 26 kDa, presente apenas no antígeno total de *F. gigantica*, parece ser específica deste parasita. Este facto leva-nos a concluir que esta banda poderá ser objecto de mais estudos, no sentido de vir a ter-se um diagnóstico diferencial entre as duas espécies de *Fasciola*.

## Abstract

The diagnosis of fascioliasis is made mainly by serological methods, due to the clinical polymorphism and the low sensitivity of parasitological methods. However, these methods have some limitations, so the improvement of immunological tests, including the use of homologous antigen, can be a factor of great importance for the specificity of diagnosis.

This study was aimed at the production and evaluation of somatic and dislipidized antigens of *F. gigantica* in immunodiagnosis of fascioliasis by the methods of Micro-ELISA and Western blot, compared with those of *F. hepatica*.

We analyzed 111 sera from individuals from Cape Verde and 67 individuals living in Portugal, of both sexes with clinical suspicion of fascioliasis. The somatic and dislipidized antigens, were produced from adult worms of *F. gigantica* collected from cattle on the Santiago Island (Cape Verde).

The two somatic antigens of *Fasciola* species showed the same sensitivity (100%) but specificity was superior to the somatic antigen of *F. gigantica* (95.2%) in the detection of IgG. Like the somatic antigen, dislipidized antigen demonstrated a sensitivity of 100%. However, the specificity was higher (95.2%) when using the dislipidized antigen of *F. hepatica* when compared to that obtained with *F. gigantica*, whose value was 90.5%. For the detection of IgM anti-*Fasciola*, the sensitivity and specificity were 97% and 90.5%, respectively, to somatic antigens of both parasites (*F. gigantica* and *F. hepatica*). In IgM anti-parasite, sensitivities were 94% and 83% for dislipidized antigens for *F. gigantica* and *F. hepatica*, respectively, with a specificity of 90.5% for both dislipidized antigens.

In immunoblotting, the antigenic fraction of 24 kDa was common in four antigenic preparations for either IgM or IgG anti-*Fasciola*, hence its characterization may be relevant to the development of methods with higher specificity and reproducibility, significantly improving the diagnosis. The band of 26 kDa antigen is present only on somatic *F. gigantica*, suggesting to be

specific to this parasite. This leads us to conclude that this band of 26 kDa could be the subject of further research, in the sense of getting to a differential diagnosis between the two species of *Fasciola*.

| Índice geral  | Página |
|---|--------|
| Agradecimentos .....  | i      |
| Resumo.....   | iii    |
| Abstract .....  | v      |
| Índice geral.....   | vii    |
| Índice de figuras .....   | xi     |
| Índice de quadros .....   | xv     |
| Abreviaturas .....  | xvii   |
| 1. Introdução .....   | 3      |
| 2. Revisão de Literatura.....   | 9      |
| 2.1. Breves dados históricos sobre a Fasciolose .....                   | 9      |
| 2.2. A fasciolose em Cabo Verde.....                                    | 10     |
| 2.3. O Parasita .....   | 15     |
| 2.3.1. <i>Morfologia</i> .....  | 15     |
| 2.3.2. <i>Diferenciação entre as duas espécies de Fasciola</i> .....    | 18     |
| 2.3.3. <i>Ciclo de vida de Fasciola spp</i> .....                       | 19     |
| 2.3.4. <i>Taxonomia</i> .....   | 22     |
| 2.4. Transmissão e disseminação da fasciolose .....                     | 23     |
| 2.4.1. <i>Desenvolvimento larvar</i> .....                              | 24     |
| 2.4.2. <i>Hospedeiros definitivos normais</i> .....                     | 25     |
| 2.4.3. <i>Adaptação a novos hospedeiros definitivos</i> .....           | 26     |
| 2.5. Desenvolvimento da doença .....                                    | 28     |
| 2.6. Hospedeiros intermediários.....                                    | 29     |
| 2.6.1. <i>Hospedeiros intermediários originais e alternativos</i> ..... | 29     |
| 2.6.2. <i>Difusão e adaptação de Fasciola spp/Lymnaea spp</i> .....     | 31     |
| 2.6.3. <i>Classificação e genotipagem de Lymnaea spp</i> .....          | 33     |
| 2.7. Ecologia e Epidemiologia .....                                     | 34     |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.8.    | As espécies de <i>Fasciola</i> e suas distribuições .....  | 38 |
| 2.9.    | Interação parasita-hospedeiro.....   | 41 |
| 2.10.   | Patologia.....   | 42 |
| 2.11.   | Diagnóstico.....   | 44 |
| 2.11.1. | <i>Diagnóstico diferencial entre as duas espécies de Fasciola</i> .....                          | 46 |
| 2.11.2. | <i>Testes serológicos – aumento da sensibilidade e especificidade</i> .....                      | 46 |
| 2.12.   | Prevenção e Controlo .....   | 47 |
| 2.13.   | Tratamento.....  | 49 |
| 2.14.   | Vacinas .....  | 51 |
| 3.      | Justificação .....   | 55 |
| 4.      | Objectivos .....   | 59 |
| 4.1.    | Objectivo Geral .....  | 59 |
| 4.2.    | Objectivos Específicos .....   | 59 |
| 5.      | Material e Métodos .....   | 63 |
| 5.1.    | Obtenção dos parasitas adultos de <i>Fasciola gigantica</i> .....                                | 63 |
| 5.2.    | Obtenção de soros humanos para a avaliação da reactividade dos antígenos.....                    | 64 |
| 5.3.    | Obtenção de antígenos de parasitas adultos de <i>F. gigantica</i> .....                          | 65 |
| 5.3.1.  | <i>Preparação de antígenos totais (AgTs)</i> .....   | 65 |
| 5.3.2.  | <i>Concentração de antígeno total</i> .....  | 66 |
| 5.3.3.  | <i>Preparação de antígenos deslipidizados (AgDs)</i> .....                                       | 66 |
| 5.3.4.  | <i>Concentração de antígeno deslipidizado</i> .....  | 66 |
| 5.3.5.  | <i>Determinação da concentração da proteína das preparações antigénicas (Figura 12)</i> .....    | 66 |
| 5.4.    | Avaliação dos antígenos pelo método imunológico – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 67 |
| 5.5.    | Perfil electroforético das proteínas presentes nos antígenos por “Western-blot” .....            | 69 |
| 5.5.1.  | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i> .....                | 70 |
| 5.5.2.  | <i>“Immunoblotting”</i> .....  | 71 |
| 5.6.    | Análise estatística.....   | 72 |

|   |     |
|---|-----|
| 6. Resultados.....  | 77  |
| 6.1. Obtenção dos parasitas adultos de <i>F. gigantica</i> .....  | 77  |
| 6.2. Obtenção dos soros humanos para o estudo.....  | 77  |
| 6.3. Obtenção e determinação da concentração proteica das preparações antigénicas .....                                     | 78  |
| 6.4. Avaliação da especificidade e sensibilidade das preparações antigénicas.....   | 79  |
| 6.5. Comparação das quatro preparações antigénicas no diagnóstico de fasciolose pelo método imunológico – Micro-ELISA ..... | 80  |
| 6.5.1. Soros de indivíduos cabo-verdianos .....   | 80  |
| 6.5.2. Soros de indivíduos residentes em Portugal.....  | 85  |
| 6.6. Perfil electroforético das proteínas presentes nas preparações antigénicas – SDS-PAGE .....                            | 90  |
| 6.7. Avaliação da reactividade das fracções antigénicas por “Western-blot” .....  | 91  |
| 6.7.1. Antigénio Total de <i>F. gigantica</i> (AgFgT) .....   | 91  |
| 6.7.2. Antigénio Total de <i>F. hepatica</i> (AgFhT).....   | 93  |
| 6.7.3. Antigénio Deslipidizado de <i>F. gigantica</i> (AgFgD).....  | 95  |
| 6.7.4. Antigénio Deslipidizado de <i>F. hepatica</i> (AgFhD) .....  | 97  |
| 7. Discussão e Conclusões.....  | 101 |
| 8. Referências bibliográficas .....   | 109 |
| Anexo 1: Preparação de antigénio total de <i>F. gigantica</i> .....   | 131 |
| Anexo 2: Preparação de antigénio deslipidizado de <i>F. gigantica</i> .....   | 132 |
| Anexo 3: Determinação quantitativa de proteínas (Método Bio-Rad Protein Assay) .....  | 133 |
| Anexo 4: Técnica de Micro-ELISA e preparação dos tampões para a execução da técnica .....                                   | 134 |
| Anexo 5: SDS-PAGE – Separação Electroforética.....  | 138 |
| Anexo 6: Immunoblotting .....   | 143 |



| Índice de figuras   | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Localização geográfica do Arquipélago de Cabo Verde, (adaptado de, De Albuquerque & Santos, 2001).....  | 11     |
| Figura 2: Morfologia interna de <i>Fasciola</i> spp, (original, António Almeida). ....  | 16     |
| Figura 3: A – <i>F. hepatica</i> adulto, B – <i>F. gigantica</i> adulto, (original, António Almeida).....   | 17     |
| Figura 4: Ciclo de vida de <i>Fasciola</i> spp, adaptado de Fumouze Diagnostics<br>( <a href="http://www.fumouze.com">http://www.fumouze.com</a> ). ....  | 21     |
| Figura 5: Taxonomia de <i>Fasciola</i> spp (original, António Almeida).....   | 22     |
| Figura 6: Novos hospedeiros definitivos de <i>Fasciola</i> spp. A - <i>Alces alces</i> (alce), B- <i>Cervus elaphus</i><br>(veado vermelho), C - <i>Capreolus capreolus</i> (corça), D- <i>Sus scrofa</i> (javali), E - <i>Castor<br/>fiber</i> (castor), F - <i>Lutra lutra</i> (lontra), G - <i>Lepus europaeus</i> (lebre),<br>( <a href="http://www.google.pt/imgres?imgurl">http://www.google.pt/imgres?imgurl</a> ). .... | 28     |
| Figura 7: Distribuição mundial das espécies de <i>Fasciola</i> (adaptado de Torgerson & Claxton, 1999).<br>.....  | 40     |
| Figura 8: Fígado parasitado com <i>F. gigantica</i> , Matadouro da Cidade de Assomada, Cabo Verde,<br>2010 (original, António Almeida).....   | 63     |
| Figura 9: Fígado no início de litíase, Matadouro da Cidade de Assomada, Cabo Verde, 2010<br>(original, António Almeida).....  | 63     |
| Figura 10: Resultado geral de soros de indivíduos cabo-verdianos e residentes em Portugal, pelos<br>métodos (ID, IED e Macro-ELISA).....  | 64     |
| Figura 11: Comparação dos resultados de soros de indivíduos cabo-verdianos e residentes em<br>Portugal, pelos métodos (ID, IED e Maro-ELISA).....   | 65     |
| Figura 12: Curva de calibração com as densidades ópticas obtidas. ....  | 67     |
| Figura 13: Número de animais inspeccionados e vermes adultos recolhidos nos matadouros na ilha<br>de Santiago, Cabo Verde.....  | 77     |
| Figura 14: Especificidade das quatro preparações antigénicas em estudo. AgFgT – antígeno total de<br><i>F. gigantica</i> , AgFgD – antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> , AgFhT – antígeno total<br>de <i>F. hepatica</i> e AgFhD – antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> . ....  | 79     |
| Figura 15: Sensibilidade das quatro preparações antigénicas em estudo. AgFgT – antígeno total de<br><i>F. gigantica</i> , AgFgD – antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> , AgFhT – antígeno total<br>de <i>F. hepatica</i> e AgFhD – antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> . ....   | 80     |



- Figura 16: Soros de indivíduos cabo-verdianos positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. gigantica*. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*. ..... 81
- Figura 17: Soros de indivíduos cabo-verdianos positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. hepatica*. AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. ..... 81
- Figura 18: Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos cabo-verdianos. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas. .... 83
- Figura 19: Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos cabo-verdianos. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas. .... 84
- Figura 20: Soros de indivíduos residentes em Portugal positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. gigantica*. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*. ..... 85
- Figura 21: Soros de indivíduos residentes em Portugal positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. hepatica*. AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. ..... 86
- Figura 22: Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos residentes em Portugal. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas. .... 88
- Figura 23: Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos residentes em Portugal. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD –

|  |    |
|--|----|
| antigénio deslipidizado de <i>F. hepatica</i> . *Diferenças estatisticamente significativas;<br>**Sem diferenças estatisticamente significativas. ....   | 89 |
| Figura 24: Perfil electroforético dos antígenos em estudo em SDS-PAGE (mini gel 15%). P –<br>padrão molecular, FGT – antígeno total de <i>F. gigantica</i> , FHT – antígeno total de <i>F.</i><br><i>hepatica</i> , FGD – antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> e FHD – antígeno<br>deslipidizado de <i>F. hepatica</i> . ....   | 90 |
| Figura 25: Fracções antigénicas de <i>F. gigantica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> ,<br>utilizando o antígeno total de <i>F. gigantica</i> (AgFgT). P – padrão de peso molecular; CP<br>– controlo positivo; 1 – larva <i>migrans</i> visceral; 2 – Cisticercose; 3 a 16 – soros de<br>indivíduos com fasciolose confirmada. ....  | 91 |
| Figura 26: Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de <i>F. gigantica</i> (AgFgT)<br>reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> . ....  | 92 |
| Figura 27: Fracções antigénicas de <i>F. gigantica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> ,<br>utilizando o antígeno total de <i>F. gigantica</i> (AgFgT). P-padrão de peso molecular. ....   | 92 |
| Figura 28: Fracções antigénicas de <i>F. hepatica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> ,<br>utilizando o antígeno total de <i>F. hepatica</i> (AgFhT). P (padrão molecular), 1 (controlo<br>positivo), 2 (larva <i>migrans</i> visceral), 3 (cisticercose), 4 a 6 (soros duvidosos de Cabo<br>Verde), 7 e 8 (soros duvidosos de Portugal), 9 a 12 (soros positivos de Cabo Verde), 14<br>a 16 (soros positivos de Portugal). ....   | 93 |
| Figura 29: Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de <i>F. hepatica</i> (AgFhT)<br>reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> . ....   | 93 |
| Figura 30: Fracções antigénicas de <i>F. hepatica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> ,<br>utilizando o antígeno total de <i>F. hepatica</i> (AgFhT). P-padrão de peso molecular. ....   | 94 |
| Figura 31: Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de <i>F. hepatica</i> (AgFhT)<br>reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> . ....   | 94 |
| Figura 32: Fracções antigénicas de <i>F. gigantica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> ,<br>utilizando o antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> (AgFgD). P (padrão molecular), 1 a<br>8 (soros positivos de Cabo Verde), 9 (controlo positivo), 10 (larva <i>migrans</i> visceral), 11<br>(cisticercose), 12 a 18 (soros positivos de Cabo Verde), 19 a 21 (soros duvidosos de<br>Cabo Verde), 22 a 24 (soros positivos de Portugal), 25 a 27 (soros positivos de Cabo<br>Verde), 28 e 29 (soros positivos de Portugal). .... | 95 |
| Figura 33: Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> (AgFgD)<br>reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> . ....  | 95 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 34: Fracções antigénicas de <i>F. gigantica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> , utilizando o antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> (AgFgD). P – padrão de peso molecular.....   | 96 |
| Figura 35: Fracções antigénicas de <i>F. hepatica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> , utilizando o antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> (AgFhD). P (padrão molecular), 1 e 2 (controlo positivo), 3 e 4 (soros positivos de Cabo Verde), 5 (soro duvidoso de Cabo Verde), 6 e 7 (soros positivos de Portugal), 8 (soro duvidoso de Portugal). .... | 97 |
| Figura 36: Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> (AgFhD) reconhecidas pelo anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> . ....  | 97 |
| Figura 37: Fracções antigénicas de <i>F. hepatica</i> reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> utilizando o antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> (AgFhD). P - padrão molecular. ...   | 98 |
| Figura 38: Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i> (AgFhD) reconhecidas pelo anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> . ....  | 98 |

| Índice de quadros  | Página |
|--|--------|
| Quadro 1: Diluição das amostras em estudo (As soluções e os procedimentos utilizados para a electroforese estão descritos no Anexo 5).....           | 71     |
| Quadro 2: Perfil dos indivíduos com soros utilizados no estudo. ....   | 78     |
| Quadro 3: Origem, data de produção e concentração proteica dos antígenios em estudo. ....  | 78     |
| Quadro 4: Níveis de concordância (Factor <i>Kappa</i> ) entre as quatro preparações antigénicas, em soros de indivíduos cabo-verdianos. ....         | 82     |
| Quadro 5: Níveis séricos de IgM (Micro-ELISA), em soros de indivíduos cabo-verdianos. ....   | 83     |
| Quadro 6: Níveis séricos de IgG (Micro-ELISA), em soros de indivíduos cabo-verdianos. ....   | 84     |
| Quadro 7: Níveis de concordância (Factor <i>Kappa</i> ) entre as quatro preparações antigénicas, em soros de indivíduos residentes em Portugal. .... | 87     |
| Quadro 8: Níveis séricos de IgM (Micro-ELISA), em soros de indivíduos residentes em Portugal. ....   | 88     |
| Quadro 9: Níveis séricos de IgG (Micro-ELISA), em soros de indivíduos residentes me Portugal. ....   | 89     |
| Quadro 10: Peso molecular das fracções antigénicas dos diferentes antígenios analisados (gel a 15%). ....  | 91     |



**Abreviaturas**

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>AgDs</b>      | Antigénios Deslipidizados  |
| <b>AgFgD</b>     | Antigénio Deslipidizado de <i>F. gigantea</i>                            |
| <b>AgFgT</b>     | Antigénio Total de <i>F. gigantea</i>                                    |
| <b>AgFhD</b>     | Antigénio Deslipidizado de <i>F. hepatica</i>                            |
| <b>AgFhT</b>     | Antigénio Total de <i>F. hepatica</i>                                    |
| <b>AgTs</b>      | Antigénios Totais  |
| <b>Ava II</b>    | Enzima de Restrição  |
| <b>bp</b>        | pares de bases   |
| <b>CO1</b>       | <i>Cytochrome c-oxidase Subunit 1</i> (Citocromo c-Oxidase subunidade 1) |
| <b>ADN</b>       | Ácido Desoxirribonucleico  |
| <b>Dra II</b>    | Enzima de Restrição  |
| <b>E/S</b>       | Excreção Secreção  |
| <b>EITB</b>      | Imunoelectrotransferência  |
| <b>ELISA</b>     | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>                                |
| <b>epg</b>       | <i>eggs per gram</i> (ovos por grama de fezes)                           |
| <b>FABP</b>      | <i>Fatty-Acid-Binding Protein</i>  |
| <b>GST</b>       | <i>Glutathione S-Transferase</i>   |
| <b>Hsp 92 II</b> | Enzima de Restrição  |
| <b>ID</b>        | Imunodifusão   |
| <b>IED</b>       | Imunoelectrodifusão  |
| <b>IEF</b>       | <i>Iso Electric Focusing</i> (Focagem Isoeléctrica)                      |
| <b>INE</b>       | Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde                          |
| <b>ITS-1</b>     | <i>Internal transcribed spacer 1</i>                                     |
| <b>ITS-2</b>     | <i>Internal transcribed spacer 2</i>                                     |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>LAP</b>      | Leucina Amino Peptidase  |
| <b>N</b>        | Norte  |
| <b>NA1</b>      | <i>NADH dehydrogenase Subunit 1</i> (NADH deidrogenase subunidade 1) |
| <b>NADH</b>     | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido                          |
| <b>NCBI</b>     | National Center for Biotechnology Information                        |
| <b>O</b>        | Oeste  |
| <b>OMS</b>      | Organização Mundial da saúde   |
| <b>p.i.</b>     | Após a infecção  |
| <b>PBS</b>      | <i>Phosphate Buffered Saline</i>                                     |
| <b>PCR</b>      | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                                     |
| <b>r.p.m.</b>   | rotações por minutos   |
| <b>RAPD</b>     | <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>                       |
| <b>Rca I</b>    | Enzima de Restrição  |
| <b>rADN</b>     | Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal                                 |
| <b>RFLP</b>     | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>                      |
| <b>ARN</b>      | Ácido Ribonucleico   |
| <b>rARN</b>     | Ácido Ribonucleico Ribossomal  |
| <b>SDS-PAGE</b> | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>     |
| <b>SO</b>       | Sudoeste   |
| <b>TA</b>       | Temperatura Ambiente   |
| <b>Th1</b>      | <i>T Helper Cell 1</i>   |
| <b>Th2</b>      | <i>T Helper Cell 2</i>   |
| <b>WHO</b>      | <i>World Health Organization</i>                                     |

# INTRODUÇÃO

---





## 1. Introdução

A fasciolose é uma zoonose cosmopolita causada por tremátodes do género *Fasciola*, que afecta o fígado e as vias biliares de muitas espécies de animais domésticos, selvagens e o próprio homem. A infecção humana ocorre acidentalmente após o consumo de plantas aquáticas comestíveis ou de água contendo metacercárias, sendo o agrião cru, o principal veículo do parasita. A infecção pode resultar em cirrose biliar, colangite esclerosante associada a icterícia destrutiva, abscessos do fígado, e outros graves problemas hepáticos e manifestações clínicas ectópicas (Kesmat *et al.*, 1999).

A fasciolose, cujos agentes causais são a *F. hepatica* e a *F. gigantica*, tem sido tradicionalmente considerada uma doença de importância veterinária por causar prejuízos económicos substanciais na pecuária, especialmente em ovinos e bovinos. Em contrapartida, a fasciolose humana sempre foi vista como uma doença secundária (Malek, 1980 e Boray, 1982).

O prejuízo económico que esta parasitose causa na pecuária a nível mundial deve-se à rejeição de um grande número de fígados nos matadouros, além da queda na produção e na qualidade do leite, da perda de peso dos animais, da diminuição da fertilidade e do crescimento, e em alguns casos pode mesmo ocasionar morte dos animais (Queiroz, 2005).

A importância da fasciolose humana na saúde pública tem, no entanto, aumentado nos últimos anos, conforme demonstrado pelo elevado número de casos registados no período de 1970 a 1990 com 2594 pessoas infectadas em 42 países situados em todos os continentes (Chen & Mott, 1990).

Segundo Mas-Coma *et al.*, (2005), estima-se que possam existir cerca de 2,4 milhões de pessoas infectadas com *Fasciola* spp no mundo e, cerca de 180 milhões estarão em risco.

Nas Américas, a zoonose por tremátodes mais encontrada é a fasciolose causada pela *F. hepatica*, um parasita de herbívoros frequente em certas zonas de pecuária. Ainda que encontrados em muitos países do mundo, os casos humanos têm sido assinalados principalmente na América Latina, em África, na Ásia e no Hawai (Rey, 2008).

O género *Fasciola* tem uma grande variedade de hospedeiros definitivos e uma distribuição geográfica extensa. Muitos animais domésticos como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e mais recentemente equinos são eficientes reservatórios do parasita (Mas-Coma *et al.*, 1997). Também os ratos (*Rattus rattus*) podem desempenhar um papel importante como reservatório e participar da dispersão geográfica da doença (Mas-Coma *et al.*, 1999a). Para além desses hospedeiros vertebrados, *Fasciola* spp necessita de hospedeiros intermediários (moluscos do género *Lymnaea*) para se desenvolver (Luz *et al.*, 1992).

Segundo Pile *et al.*, (1999) e Echevarria (2004), citado por Braga (2008), a fasciolose é uma doença cuja epidemiologia está fortemente associada à temperatura e disponibilidade de água. Além disso, segundo Mattos *et al.*, (1977), citado por Braga (2008), a fasciolose deve ser sempre considerada na investigação de causas como anemia, emagrecimento ou mortalidade de bovinos e ovinos em áreas favoráveis à presença de *Fasciola* spp. Sabe-se contudo, que a epidemiologia da fasciolose está vinculada a vários factores, nomeadamente: climáticos, topográficos, pressão dos pastos, presença de hospedeiros que actuam como agentes facilitadores de sua disseminação, maior ou menor disponibilidade de metacercárias e presença dos ovos do tremátode nos pastos.

A fasciolose humana foi considerada uma doença zoonótica secundária até meados dos anos noventa. Actualmente é uma parasitose emergente ou re-emergente em muitos países, devido a várias razões, incluindo o aumento da prevalência, intensidade e expansão geográfica (Mas-Coma, 2004), estando isso relacionado com fenómenos como, as alterações ambientais e modificações antrópicas (Mas-Coma *et al.*, 2005) e às mudanças ambientais associadas com o aquecimento global, que têm promovido a expansão das populações dos moluscos *Lymnaea* (Mitchell, 2002).

Face a esta situação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1995) lançou uma iniciativa mundial de luta contra a fasciolose humana com especial ênfase sobre a transmissão, estudos epidemiológicos e controlo, principalmente por meio de tratamentos com triclabendazole (Egaten<sup>®</sup>), um fármaco altamente eficaz em dose única. Os resultados recentes desta iniciativa da OMS proporcionaram um novo conhecimento sobre esta helmintose, o que tem sido suficiente para

justificar a inclusão da fasciolose na lista de doenças parasitárias importantes para os humanos (Hopkins, 1992; Rim *et al.*, 1994 e Mas-Coma, 2004).

Assim, a emergência e a re-emergência desta helmintose zoonótica em várias partes do mundo, veio alertar para a necessidade de se efectuar uma vigilância persistente em relação a ela.



# REVISÃO DE LITERATURA

---



## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Breves dados históricos sobre a Fasciolose

A primeira citação de *F. hepatica* remonta ao século IX, quando foi citada como a causa da “doença do fígado” de ovinos, no *I Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe*, no ano 865 a.C. (Erk, 1977 e Rezende, 1979). As lesões encontradas no fígado de animais só foram relacionadas com a presença de *F. hepatica* em 1739 por Jehan e Brie, citado por Taylor, (1965). Foi ainda o primeiro tremátode a ter o seu ciclo de vida descrito, depois de estudos realizados por Leuckart e colaboradores, em 1882, na Alemanha, onde citaram a participação da *L. truncatula* como seu hospedeiro intermediário (Rezende, 1979 e Mendes, 2006).

A fasciolose humana foi registada pela primeira vez por Pallas em 1760 (Pêsoa & Martins, 1982). A primeira epidemia de fasciolose foi descrita em França em 1956, e o agrião disperso na natureza foi apontado como o principal causador da infecção em humanos, principalmente nas áreas onde a fasciolose animal também é uma endemia. Este país tem o maior número de casos positivos referidos por utilizar, eventualmente, melhores técnicas de diagnóstico e, contudo, não se pode garantir que seja necessariamente, o país com o maior número de casos (de Oliveira, 2007).

A espécie *F. hepatica* foi o primeiro tremátode parasita conhecido, descoberto por Jean e Brie, em 1739. Este parasita pode afectar o homem através do consumo do agrião, outros vegetais e água, razão pela qual não pode ser considerada como uma simples zoonose secundária, mas sim uma doença humana (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

No passado, a fasciolose estava limitada a áreas geográficas específicas e típicas, mas actualmente está muito difundida em todo o mundo, com casos humanos cada vez mais relatados na Europa, Américas e Oceânia (onde só *F. hepatica* é transmitida) e na África e Ásia (onde as duas espécies de *Fasciola* se sobrepõem). Como consequência, a fasciolose humana deve ser considerada como uma zoonose de importância mundial e regional (WHO, 2007).

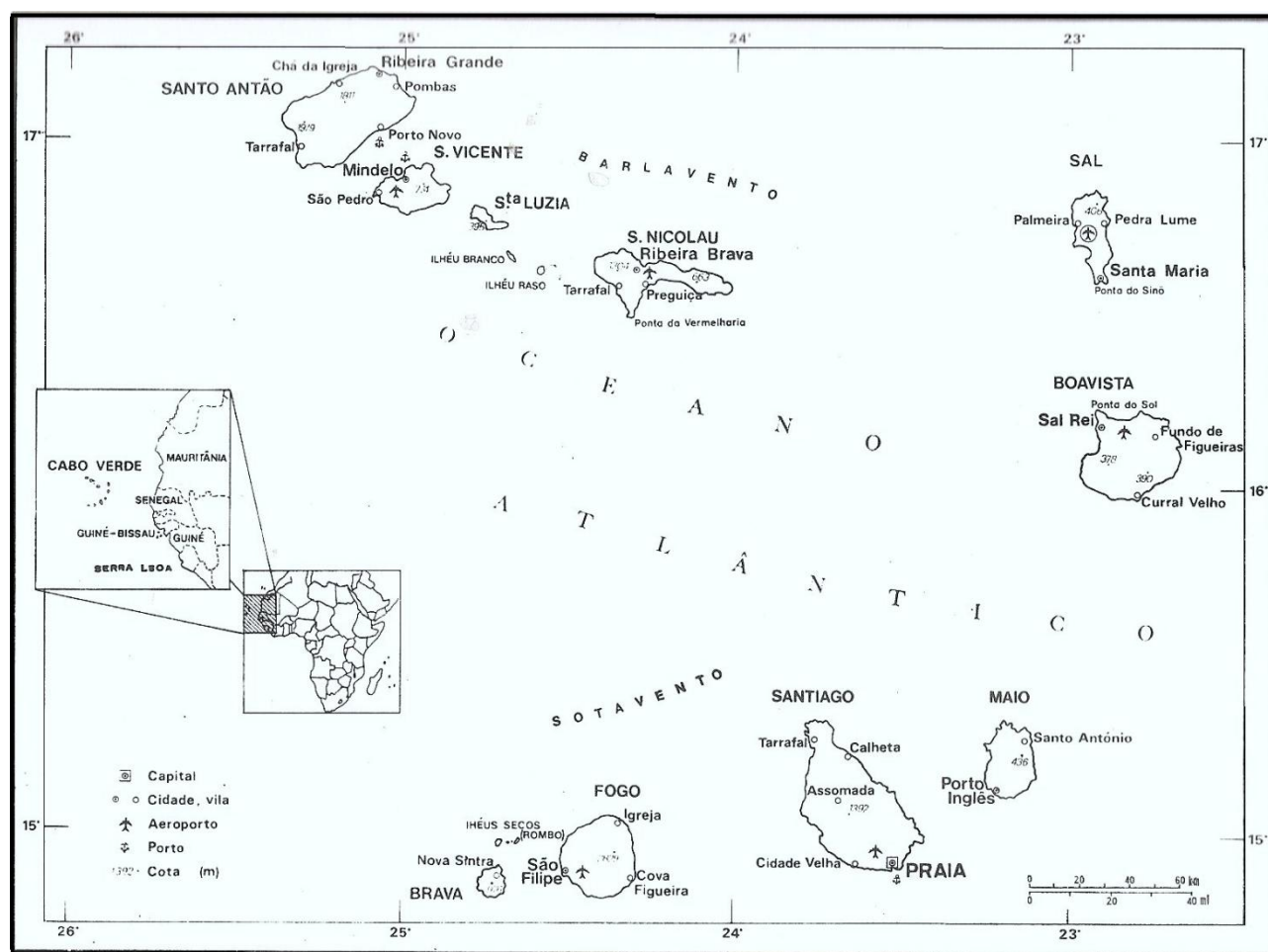


Existem muitos estudos sobre coprólitos humanos em que ovos de *Fasciola* spp foram encontrados, sugerindo que a fasciolose era comum nos seres humanos na pré-história (Bouchet, 1991, 1994, 1995a, 1995b, 1997; Bouchet *et al.*, 1998; Dommelier *et al.*, 1998; Aspöck *et al.*, 1999; Lavazec *et al.*, 2000 e Dittmar & Teegen, 2003). Com efeito, *Fasciola* spp foi encontrada nas populações humanas na pré-história, Idade da Pedra, no final do período Mesolítico, 5000-5100 anos atrás, e no Neolítico, um período marcado pela domesticação de animais e o desenvolvimento da agricultura. A espécie *F. hepatica* também foi encontrada na Idade de Bronze, bem como nos antigos europeus do período de Galo-Romanos e da Idade Média (Bouchet *et al.*, 2003).

## **2.2. A fasciolose em Cabo Verde**

O arquipélago de Cabo Verde fica situado no Oceano Atlântico entre 14° 48' e 17° 12' 30'' de latitude N e 22° 44' e 25° 22' de longitude O, a cerca de 455 km da costa ocidental do continente africano e a 1400 km a SO das Canárias, entre o Trópico de Câncer e o Equador, com a superfície total de 4.033km<sup>2</sup>, sendo a ilha de Santiago a de maior dimensão, com cerca de 990 km<sup>2</sup> e onde se localiza a capital Praia. Compõe-se de dez ilhas e oito ilhéus, divididos em dois grupos, Barlavento e Sotavento, de acordo com a sua posição relativa ao vento dominante de Nordeste (ventos alísios). Pertencem ao grupo de Barlavento as ilhas de Santo Antão, S. Vicente, Santa Luzia, S. Nicolau, Sal e Boa Vista e os ilhéus dos Pássaros, Branco e Raso; e ao Sotavento as ilhas do Maio, Santiago, Fogo e Brava e os ilhéus de Santa Maria, Luís Carneiro, Sapado Grande e Cima (Figura 1), (Gomes, 2006).

Conforme o recenseamento efectuado em 2008, a população de Cabo Verde era de 500 000 habitantes, sendo a população maioritariamente feminina (51,6%) e muito jovem, uma vez que cerca de 59% da população tem menos de 25 anos (INE, 2008). A ilha de Santiago é a que regista maior número de habitantes, cerca de 54% do total da população e a maioria reside no meio urbano (Rosa, 2002).



**Figura 1:** Localização geográfica do Arquipélago de Cabo Verde, (adaptado de, De Albuquerque & Santos, 2001).

Pela sua situação geográfica, Cabo Verde insere-se no grupo de países Sahelianos, com um clima tropical seco, cuja principal característica é a seca, na dependência de fenómenos que acompanham as migrações anuais e seculares de convergência inter-tropical (Amaral, 1964).

O clima geral de Cabo Verde é determinado pela insularidade, pela latitude, pela influência da corrente fria das Canárias e dos ventos alísios de nordeste (Amaral, 1964).

No arquipélago existem duas estações distintas: a da seca, mais longa, entre Dezembro e Junho, e a das chuvas, entre Agosto e Outubro. Os meses de Julho e Novembro são considerados de transição, e consoante os anos, são mais secos ou mais chuvosos. As precipitações concentram-se, sobretudo, na estação das chuvas, durante a qual se regista 90% do total anual. Ocorrem num número reduzido de dias, que raramente excede os 10%. A este facto associa-se ainda uma forte

concentração horária, pelo que têm, no geral, um carácter de aguaceiro de forte intensidade (Costa, 1996).

As temperaturas médias anuais (24,3°C) são moderadas pelo efeito altitude e pela influência marítima ao redor das ilhas, com valores máximos extremos no mês de Setembro e mínimos em Fevereiro (Gomes, 2006).

Em Cabo Verde, foram descritos dois casos da doença humana na ilha de Santiago em 1966, sendo um caso de fasciolose hepática (Meira, 1966) e o outro de fasciolose subcutânea (Meira & Santa-Rita, 1966).

Em 1998 em França, Nozais, *et al.*, relataram um caso de fasciolose por *Fasciola* spp com localização hepática e gástrica, num cidadão cabo-verdiano. A suspeita do parasita foi devida à presença de ovos em amostras histológicas de biopsia gástrica e foi confirmada por serologia (imunoelectroforese), enquanto os exames parasitológicos das fezes foram negativos. O doente ficou curado após o tratamento com triclabendazole. Os autores concluíram que embora, localizações ectópicas na fasciolose sejam clássicas, elas são geralmente encontradas na parede abdominal, com menor frequência na parede gástrica ou cólon. A ocorrência da contaminação em Cabo Verde é indiscutível, uma vez que o doente não tinha saído do país. Este foi o 5º caso descrito até então, na literatura médica, confirmando assim, a presença de *F. gigantica* (ou *F. hepatica*) em Cabo Verde, cuja população é de origem Portuguesa e Africana e manteve os hábitos alimentares do antigo poder colonial (Portugal é uma zona de alta endemicidade para a fasciolose humana).

Na década de noventa (séc. XX), 58 doentes apresentaram-se no hospital Agostinho Neto, Ilha de Santiago, Cabo Verde, com as seguintes manifestações clínicas: febre, dor abdominal, hepatomegalia, eosinofilia, abscessos no fígado e anemia. Esses doentes foram diagnosticados para fasciolose, usando métodos imunológicos, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal, tendo sido registada uma prevalência de 44,83% (Grácio & Azevedo, 1998).

A infecção por *F. hepatica*, não é frequentemente descrita nos Estados Unidos, mas Graham, *et al.*, (2001) descreveram dois casos de fasciolose em cidadãos de origem cabo-verdiana, que

apresentaram o espectro clínico de fasciolose. O primeiro teve doença extensiva e foi submetido a múltiplos procedimentos diagnósticos antes do diagnóstico correcto ser alcançado, já o segundo, que tinha poucos sintomas, foi diagnosticado por métodos não invasivos. Ambos foram tratados com triclabendazole, sem efeitos colaterais significativos. Os autores concluíram que a fasciolose importada pode iludir o diagnóstico rápido ou exacto, assim, a obtenção de uma história detalhada dos doentes e o conhecimento do quadro clínico no início do curso da infecção pode permitir a identificação em tempo útil e não invasivo da infecção. Confirmou-se que triclabendazole é o fármaco recomendado para o tratamento de fasciolose, devido às suas eficácia, segurança e facilidade de uso.

Ka *et al.*, (2002), relataram dois casos de fasciolose hepatobiliar em indivíduos que viviam no Senegal e Cabo Verde, o que é curioso visto que, nenhum caso semelhante tinha sido descrito até então. O primeiro caso foi uma mulher de 41 anos, que apresentou hepatomegalia dolorosa com hipereosinofilia, sem febre, e o segundo caso foi um homem de 32 anos, que apresentou também, hepatomegalia, hipereosinofilia e febre. As características clínicas e inquéritos epidemiológicos em ambos os casos verificaram estadias em Cabo Verde antes da doença. Isto foi consistente com uma contaminação naquela região. Em ambos os casos, quer *F. hepatica* ou *F. gigantica* poderiam ser responsáveis, uma vez que os testes serológicos não são capazes de diferenciar estas duas espécies. Diante disto, concluiu-se que, hepatopatias parasitárias devem ser reconhecidas especialmente quando um processo doloroso do fígado está associado a hipereosinofilia e que os testes serológicos ajudarão a estabelecer o diagnóstico perante estes casos.

Em 2002, Oliveira *et al.*, descreveram em Portugal, quatro casos clínicos de doentes provenientes de Cabo Verde, que se apresentavam com febre de evolução prolongada, emagrecimento, hepatomegalia dolorosa, anemia, hipereosinofilia, velocidade de sedimentação (VS) superior a 100, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e elevação da fosfatase alcalina e de gamaglutamiltranspeptidase ( $\gamma$ -GT). O exame de fezes revelou ovos de *Fasciola* spp e a serologia foi positiva. A tomografia abdominal computadorizada (TAC) revelou hepatomegalia com

múltiplas lesões focais hipocaptantes, de localização periférica e de aspecto ramificado. O triclabendazol foi o fármaco utilizado para o tratamento. A melhoria clínica, laboratorial, imagiológica e a boa tolerância terapêutica, fazem deste fármaco o tratamento de escolha na fasciolose hepática humana, perante a já comprovada pouca eficácia terapêutica e a existência de múltiplos efeitos colaterais dos fármacos anteriormente utilizados no tratamento desta doença, como o bitionol, emetine, albendazole e praziquantel.

Pile & Semedo, (2006), realizaram uma análise comparativa usando dados compilados no período de 1994/1995, em matadouros localizados em diferentes concelhos/ilhas de Cabo Verde, e de resultados obtidos em trabalho realizado por Pile & Semedo no período de Janeiro/Dezembro de 2005 no concelho de São Domingos, Santiago. Os resultados demonstraram altas taxas de infecção animal, com prevalências de 13,8% e 34,7% nos períodos de 1994/1995 e 2005, respectivamente, indicando um aumento significativo dos casos.

Semedo (2006), realizou uma avaliação epidemiológica da fasciolose numa localidade do Concelho de São Domingos, ilha de Santiago, com a finalidade de estabelecer as taxas de infecção da fasciolose entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, onde obteve taxas de infecção de 0,42% em alunos, 27,3% em moluscos do género *Lymnaea* e de 34,5% em ruminantes.

Um outro estudo realizado por Pile *et al.*, (2008) sobre a fasciolose entre doentes com distúrbios gastro-hepáticos em Santiago, teve como objectivo registar a variação sazonal e determinar os factores que estariam influenciando a fasciolose entre indivíduos com distúrbios gastro-hepáticos atendidos no Hospital Agostinho Neto, naquela cidade. Os resultados indicaram uma prevalência da infecção de aproximadamente 33%; ampla variação da taxa de ocorrência, relacionada com a falta de chuvas e baixas temperaturas; e aumento significativo do número de casos em Novembro, verificando-se maior disponibilidade de metacercárias, indicada pela taxa de infecção humana, em ambientes com microclimas mais frescos e com a presença de ruminantes com maior taxa de infecção.

Matos (2008), determinou a taxa de ocorrência e redistribuição da fasciolose animal na ilha de Santiago e constatou a presença dos moluscos *L. natalensis* em 15 biótopos diferentes nesta mesma ilha. Obteve uma taxa de infecção de 37,15% e 51,51% em bovinos e moluscos (*L. natalensis*), respectivamente.

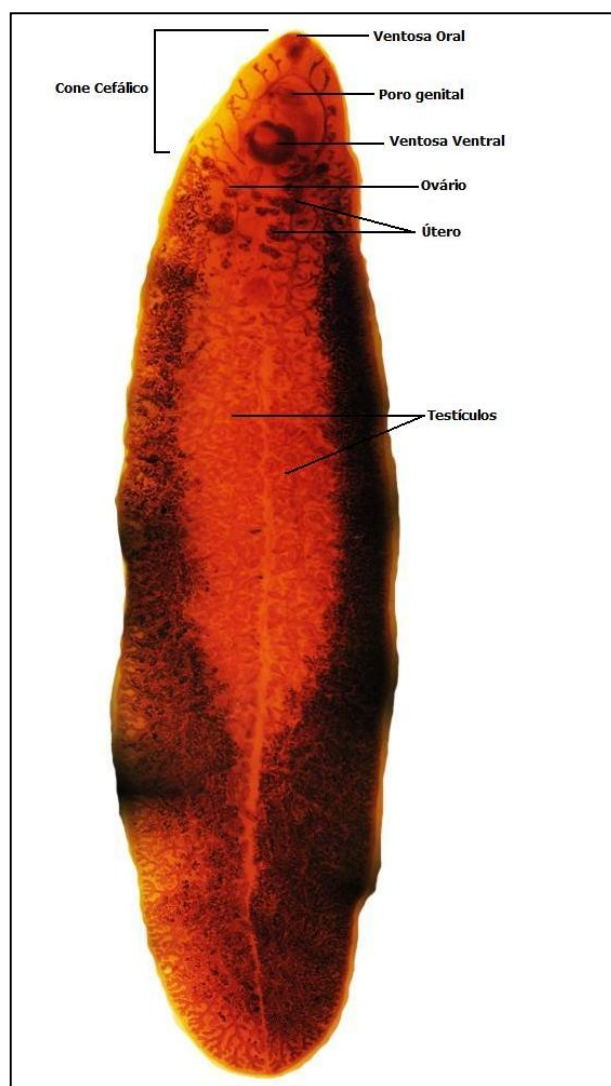
Vários autores têm referido a presença de moluscos *Lymnaea* spp em Cabo Verde, nomeadamente nas ilhas de: Santo Antão (*L. natalensis* e *L. auricularia*, em 1865 por Reibisch); Santiago (*L. natalensis* e *L. auricularia*, em 1882 por Rochebrune); São Nicolau (*L. natalensis*, em 1958 por Panelius e em 1909 por Nobre); Boavista (*L. natalensis*, em 1958 por Panelius) e Brava (*L. natalensis*, em 1909 por Nobre), citado por Rosa, (2002).

Nas pesquisas de campo que efectuei nos meses de Janeiro a Março de 2010 em Cabo Verde, constatei a presença do molusco *L. natalensis* na Ribeira dos Camarões, ilha de São Nicolau e na lagoa de São Domingos na ilha de Santiago.

## 2.3. O Parasita

### 2.3.1. Morfologia

As espécies de *Fasciola* possuem ventosa oral e ventral de tamanho aproximadamente igual, localizadas na região anterior do corpo do parasita, conhecida como cone cefálico. O corpo é achatado e coberto por um tegumento espinhoso. O intestino é ramificado, com numerosos divertículos que se estendem nas extremidades anterior e posterior do corpo do parasita. Apresentam cegos com numerosas ramificações, que atingem a extremidade do corpo. Os testículos são ramificados, situado um atrás do outro, na parte posterior. O ovário é ramificado e anterior aos testículos. O poro genital situa-se acima da ventosa ventral (Figura 2). Os vermes adultos vivem nos canais biliares intra-hepáticos, onde podem sobreviver cerca de 10 anos (Mas-Coma, 2004; Norbury, 2008 e Nguyen *et al.*, 2009).



**Figura 2:** Morfologia interna de *Fasciola* spp, (original, Ant3nio Almeida).

A espécie *F. hepatica* Linnaeus, 1758, é um trematóde grande com cerca de 20-50 mm de comprimento e 6-13 mm de largura. O cone cefálico é proeminente e os “ombros” acentuados (Figura 3A). Os ovos são grandes (130-150  $\mu\text{m}$  x 60-90  $\mu\text{m}$ ), castanhos-amarelados e não embrionados no momento de postura. A espécie *F. gigantea* Cobbold, 1856, distingue-se da espécie *F. hepatica* pelo seu maior tamanho (24-76 mm de comprimento e 5-13 mm de largura), cone cefálico mais curto e “ombros” menos acentuados (Figura 3B). Os ovos são pouco maiores (160-190  $\mu\text{m}$  x 70-90  $\mu\text{m}$ ) (Mas-Coma, 2004; Norbury, 2008 e Nguyen *et al.*, 2009).



**Figura 3:** A – *F. hepatica* adulto, B – *F. gigantica* adulto, (original, António Almeida).

Ambos os parasitas são hermafroditas, reproduzindo-se por auto-fecundação ou fecundação cruzada. Os aparelhos digestivos são incompletos. As duas ventosas e as espículas nas suas cutículas de revestimento, auxiliam na sua fixação (Queiroz, 2005).

As espécies de *Fasciola* são polimórficas e podem variar morfológicamente em função do hospedeiro que parasitam. Portanto, a morfologia e a análise fenotípica nem sempre podem ser usadas para distinguir de forma confiável as duas espécies (Stunkard, 1957; Lee & Zimmerman, 1993 e Lofty & Hillyer, 2003).



### **2.3.2. Diferenciação entre as duas espécies de Fasciola**

Tem havido algumas incertezas taxonómicas sobre as espécies de *Fasciola*, particularmente na Ásia devido a uma série de tipos morfológicos (Kendall, 1965). A hibridação cruzada interespecífica foi encontrada na Coreia (Agatsuma *et al.*, 2000) e no Japão (Kendall, 1965), e tem sido descrita evidências por análise molecular de hibridação natural entre *F. hepatica* e *F. gigantica* (Agatsuma *et al.*, 2000). Este facto, associado aos diferentes hospedeiros intermediários e definitivos do parasita *Fasciola* spp, levou alguns pesquisadores a sugerir a possibilidade de existirem subespécies ou linhagens evolutivas distintas (Dosay-Akbulut *et al.*, 2005).

Devido aos problemas associados à diferenciação entre as espécies de *Fasciola* usando técnicas morfológicas, cromossómicas e bioquímicas, uma grande componente de pesquisa usando técnicas de biologia molecular tem sido realizada para tentar resolver o problema de identificação, (Norbury, 2008).

As técnicas de focagem isoelectrica (IEF) e de electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) têm sido utilizadas para diferenciar *F. hepatica* de *F. gigantica* (Lee *et al.*, 1992a; Lee *et al.*, 1992b; Lee *et al.*, 1992c; Lee & Zimmerman, 1993; Allam *et al.*, 2002 e Lotfy *et al.*, 2002). A identificação das espécies utilizando antígenos de *F. hepatica* e *F. gigantica* em casos de fasciolose humana aguda também têm sido descritos (Allam *et al.*, 2002).

Diferentes regiões do ADN foram sequenciadas para determinar a diversidade e diferenciação entre as espécies de *Fasciola* de locais distintos. As regiões de ADN amplificadas incluem citocromo *c*-oxidase subunidade 1 (CO1) e o NADH deidrogenase subunidade 1 (ND1), do ADN mitocondrial, bem como *internal-transcribed spacer 1* (ITS1) e 2 (ITS2), e 28S rDNA (28S) do ADN nuclear (Adlard *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1997; Itagaki & Tsutsumi, 1998; Itagaki *et al.*, 1998; Abdel Tawab *et al.*, 2000; Agatsuma *et al.*, 2000; Marcilla *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Morozova *et al.*, 2004; Dosay-Akbulut *et al.*, 2005; Nolan & Cribb, 2005; Itagaki *et al.*, 2005a; Itagaki *et al.*, 2005b; Abdel Tawab *et al.*, 2006; Semyenova *et al.*, 2006 e Lin *et al.*, 2007).

### 2.3.3. Ciclo de vida de *Fasciola* spp

O ciclo de vida de *Fasciola* spp (Figura 4) é heterexênico, uma vez que o parasita necessita de dois hospedeiros, um hospedeiro intermediário (moluscos do género *Lymnaea*) e um definitivo (herbívoros e acidentalmente os humanos) para completar o seu ciclo de vida (Neves, 2005).

Quando adulto, o parasita localiza-se no interior de ductos biliares do fígado, normalmente nos de médio e pequeno diâmetro, onde fica enrolado, podendo causar obstrução. A presença do parasito causa espessamento e calcificação dos ductos. O parasito produz ovos operculados que, devido à bile, ficam com uma coloração castanha-amarelada característica (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).

Os ovos postos são levados pela bile até ao intestino, sendo encontrados no animal parasitado grande quantidade de ovos na vesícula biliar. Estes são eliminados no ambiente juntamente com as fezes, onde, em condições favoráveis de temperatura e de humidade, eclodem em aproximadamente 9 a 15 dias, libertando através do opérculo uma larva ciliada denominada miracídio, o qual nada velozmente até encontrar um molusco do género *Lymnaea*, hospedeiro intermediário do parasita (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).

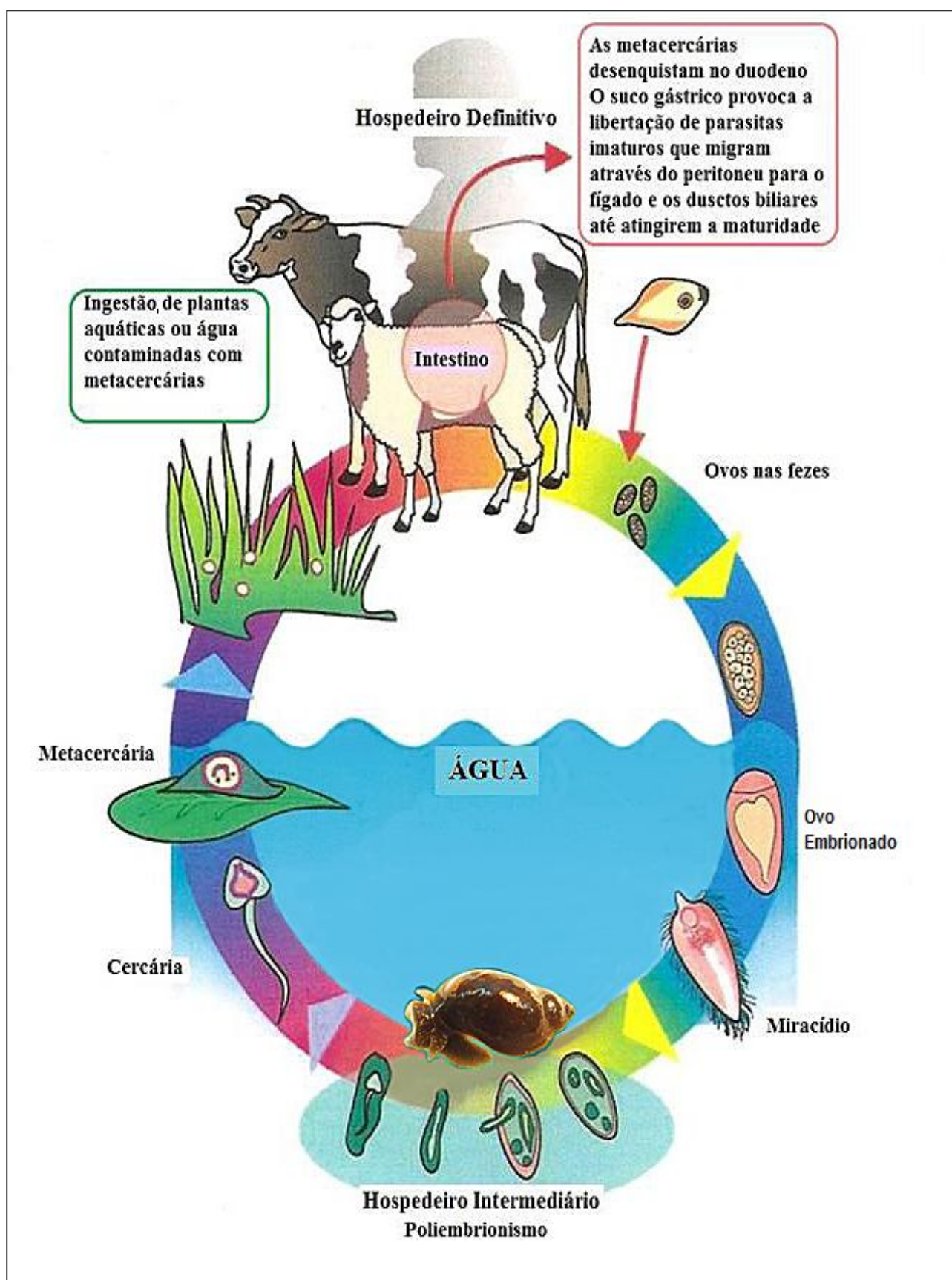
O miracídio é muito frágil, e morre em poucas horas (aproximadamente 8 horas) se não encontrar o hospedeiro intermediário. Ele penetra activamente atravessando o epitélio de revestimento das partes moles do molusco e, na sua musculatura, forma uma estrutura denominada esporocisto que ao desenvolver-se liberta células que migram para o hepatopâncreas do molusco onde se transforma em rédias. Estas por sua vez, ao encontrar condições adversas, dão origem a rédias filhas e netas, retardando assim o processo, mas em contrapartida aumenta o número de parasitas (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).

No interior de cada rédia formam-se então várias cercárias, que apresentam uma cauda e duas ventosas. Estas abandonam o molusco e nadam até encontrarem uma superfície para se fixar,

podendo esta ser uma folha vegetal (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).

Após a fixação, as cercárias formam uma membrana quística e assumem uma forma resistente, infectante, denominada metacercária. A metacercária pode resistir até um ano no ambiente. O ciclo, no interior do molusco, dura de 30 a 45 dias (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).

Os hospedeiros definitivos do parasito infectam-se ao ingerirem plantas aquáticas ou água contaminadas com metacercárias. Estas, ao atingirem o intestino delgado perdem a membrana quística, que atravessam a parede do intestino, se deslocam pelo peritoneu e atravessam a cápsula de Glisson do fígado, migrando pelo parênquima hepático por cerca de seis semanas, até atingirem um ducto biliar, onde após cerca de quatro semanas atingem o estado adulto e começam a produzir ovos, iniciando assim, um novo ciclo (Dunn, 1983; Veronesi, 1985; Duménigo *et al.*, 1999 e Urquhart *et al.*, 2001).



**Figura 4:** Ciclo de vida de *Fasciola* spp, adaptado de Fumouze Diagnostics (<http://www.fumouze.com>).

### 2.3.4. Taxonomia

Relativamente à taxonomia (Figura 5), de acordo com (Lotfy, *et al.*, 2008; Keiser & Utzinger, 2009 e NCBI Taxonomy Browser, 2010) o género *Fasciola* pertence:



**Figura 5:** Taxonomia de *Fasciola* spp (original, António Almeida).

## 2.4. Transmissão e disseminação da fasciolose

O ciclo de vida das duas espécies de *Fasciola* é semelhante e dura cerca de 14-23 semanas. É composto por quatro fases (Mas-Coma & Bargues, 1997 e Mas-Coma *et al.*, 2003):

Fase A: Os hospedeiros definitivos portadores de vermes adultos, eliminam ovos que atingem o ambiente através da bile e do intestino; o hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de metacercárias; em seres humanos, os vermes atingem maturidade sexual em 3-4 meses, e sua esperança média de vida é entre 9 e 13,5 anos.

Fase B: A passagem entre mamíferos hospedeiros definitivos e moluscos hospedeiros intermediários inclui a longa fase de resistência do ovo e a curta fase activa de miracídio; ovos eliminados com as fezes de mamíferos continuarão o seu desenvolvimento em água doce com características físico-químicas apropriadas (principalmente à temperatura de 15-25°C).

Fase C: O desenvolvimento no molusco inclui a penetração do miracídio que evolui para esporocisto, gerações de rédias, produção de cercárias e eliminação desta última na água; o período pré-patente (38-86 dias) é dependente da temperatura (temperaturas mais elevadas reduzem este período).

Fase D: A passagem entre os hospedeiros intermediários e definitivos inclui a curta fase de natação das cercárias e a longa fase de resistência das metacercárias; o processo de eliminação ocorre entre 9 e 26°C, independentemente da luz; cercárias nadam por um curto tempo, até entrar em contacto com um suporte sólido, principalmente folhas de plantas aquáticas acima ou abaixo da linha de água, para se fixarem e enquistarem; metacercárias enquistadas tornam-se infectantes dentro de 24 h.

O desenvolvimento de *Fasciola* é muito dependente de características ambientais durante as fases B, C e D e é marcadamente influenciada pelas actividades humanas durante a fase A (Mas-Coma, 2004).

#### **2.4.1. Desenvolvimento larvar**

A capacidade de expansão do género *Fasciola* está relacionada com a grande capacidade de colonização e adaptação das suas espécies a novos ambientes, até mesmo em elevadas altitudes onde as condições de adaptação são escassas. O desenvolvimento de *F. hepatica* em *Galba* (*Lymnaea*) *truncatula* no norte do Altiplano Boliviano, área endémica de altitude entre 3800-4100 metros, foi comparado com o seu homólogo europeu. Nos locais de altitude elevada, surgem aspectos particulares que fazem com que a transmissão seja favorecida, nomeadamente maior período de produção e eliminação de cercárias. Ambos os aspectos estão relacionados com a maior capacidade de sobrevivência de moluscos da família *Lymnaeidae* infectados. Além disso, foi encontrada uma discrepância na distribuição de cercárias durante o período da sua eliminação. Enquanto que no modelo boliviano o maior número diário de cercárias é eliminado na primeira semana, no modelo europeu isto acontece mais tarde (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Um aspecto a realçar é a sobrevivência de moluscos do género *Lymnaea* em estudos experimentais realizados com *F. hepatica* e *L. truncatula* do norte do Altiplano Bolíviano. A longevidade de moluscos bolivianos experimentalmente infectados após o momento de exposição aos miracídios foi maior do que nas espécies *L. truncatula* da Europa, e também maior do que nas *Lymnaea* spp americanas, como *L. viatrix* e *L. bulimoides*. A capacidade de *Lymnaea* spp do Altiplano Boliviano de sobreviver por mais de 4 meses após o final do período de eliminação de cercárias era surpreendente, enquanto que os moluscos europeus morriam, imediatamente durante ou pouco depois da eliminação das cercárias. Além disso, a ausência de diferenças de sobrevivência entre os moluscos parasitados e não parasitados sugere uma melhor adaptação parasita-hospedeiro na Bolívia (Mas-Coma *et al.*, 2001).

A capacidade da espécie *F. hepatica* de produzir maior número de formas larvares quando infecta espécies de *Lymnaea* de outros lugares, também pode estar relacionada com a sua rápida

capacidade de expansão geográfica. Isto foi detectado na Europa, quando *L. truncatula* de diferentes origens geográficas foi infectada experimentalmente com *Fasciola* spp (Gasnier *et al.*, 2000).

#### **2.4.2. Hospedeiros definitivos normais**

A espécie *F. hepatica* é um parasita comum dos ruminantes, especialmente ovinos, caprinos, e bovinos. Hospedeiros alternativos são cavalos, burros, mulas e camelídeos. Mamíferos herbívoros selvagens, tais como búfalos, veados, carneiros selvagens, porco do mato, vários marsupiais, coelho, lebre, e nutria, também são hospedeiros susceptíveis, assim como várias espécies selvagens em África, incluindo macacos. A espécie *F. gigantica* é comum em ovinos, caprinos, bovinos e búfalos e também tem sido relatada em camelos, suínos, cavalos, burros, antílopes maiores, veados, girafas e zebras e, ocasionalmente em nutria, macacos e muitos outros animais selvagens africanos (Mas-Coma & Bargues 1997).

Prevalências e cargas parasitárias nos principais reservatórios, não se correlacionam necessariamente com a infecção humana. As prevalências e cargas parasitárias podem ser relativamente elevadas nos principais reservatórios, quando os casos humanos são apenas esporádicas (situação nas áreas endémicas de animais), ou podem ser muito elevadas em seres humanos, mas relativamente baixas em animais (situação nas áreas hiperendémicas humanas). Um bom exemplo é o Altiplano Boliviano, onde as prevalências nos principais hospedeiros (ovinos, bovinos) e secundários (suínos, asininos) não são suficientemente altas para explicar as prevalências detectadas nos humanos: 49,1-87,0% (média de 61,6%) em ovinos; 0-66,6% (23,8%) em gado, 27,1% em suínos, 15,4% em burros, e 0-72% (15,4%) em humanos (Buchon *et al.*, 1997; Mas-Coma *et al.*, 1997, Grock *et al.*, 1998; Esteban *et al.*, 1999 e Mas-Coma *et al.*, 1999c). Além disso, não há diferença significativa na infecciosidade entre isolados de diferentes espécies de hospedeiros (Valero & Mas-Coma 2000 e Valero *et al.*, 2001a).



#### **2.4.3. Adaptação a novos hospedeiros definitivos**

O tremátode *F. hepatica* foi bem sucedido na expansão da sua origem europeia, devido à exportação de gados europeus para colonizar os cinco continentes, onde se adaptou a outras espécies de mamíferos autóctones, como camelídeos em África, auquenidos na América do Sul e marsupiais na Austrália. A capacidade do parasita em se adaptar rapidamente a novas espécies de hospedeiros definitivos é ilustrada, pelos exemplos como rato preto, nutria e suínos (Mas-Coma *et al.*, 2003).

Na Córsega, existem habitats em que os seres humanos são contaminados, mas os hospedeiros definitivos normais (animais) não estão presentes. Nesses locais, *Rattus rattus* tem provado ser um reservatório, com prevalência muito alta de até 45,1% e cargas parastárias de 1-12 (média 3,04) adultos por ratos, em determinados focos. Os ratos pretos mostram um número médio de ovos eliminados por parasita por dia (850-2150) menor do que em ovinos (8800-25000) ou em bovinos (10000-12000), mas muito superiores aos eliminados por coelhos (19-69). Assim, *R. rattus* pode contribuir para o ciclo de vida do parasita e desempenhar um papel de reservatório da doença (Mas-Coma *et al.*, 2003).

Um fenómeno semelhante foi detectado em nutria, *Myocastor coypus*, um roedor recentemente introduzido em França. As prevalências encontradas foram muito elevadas, 40,1%, em áreas de fasciolose, com 90% dos nutrias infectados eliminando ovos. A carga parasitária média foi de 5,7 parasitas por nutria, com 65% de parasitas adultos. O nutria isolado permitiu o desenvolvimento completo do parasita até uma posterior infecção em ovinos. Este roedor pode ser considerado um potencial reservatório silvestre. A sua dispersão em toda a França e nos países vizinhos, tem contribuído para a expansão do parasita (Menard *et al.*, 2001).

Tem sido relatado que o porco oferece uma resistência natural considerável à infecção pelo parasita *Fasciola* e inclusive, foi mesmo considerado um hospedeiro inadequado para as espécies de *Fasciola*. Embora o parasitismo natural por *F. hepatica* em suínos ocorra apenas ocasionalmente na

Europa, a fasciolose no porco é comum em outras áreas geográficas, como na África e América do Sul (Mas-Coma *et al.*, 2003). Além disso, no Altiplano Boliviano, o desenvolvimento de vermes adultos da espécie *F. hepatica* no porco é semelhante ao de ovinos e bovinos (Valero *et al.*, 2001a, 2001b), e não há diferenças na infecciosidade das metacercárias (Valero & Mas-Coma, 2000). Tudo isto indica que os suínos devem ser tidos em conta na aplicação das medidas de controlo.

Estudos recentes sobre isoenzimas, sequências de proteínas e sequências de ADN mitocondrial sugerem que as duas espécies de *Fasciola* são capazes de desenvolver capacidade para a selecção de espécies de hospedeiros definitivos (Miller *et al.*, 1993; Panaccio & Trudgett, 1999 e Spithill *et al.*, 1999a). Na Bielorrússia, por exemplo, *Fasciola* spp tem sido encontrada em sete espécies de animais selvagens: alce - *Alces alces* (5,6% prevalência), veado vermelho - *Cervus elaphus* (31,3%), corço(a) - *Capreolus capreolus* (6,3%), javali - *Sus scrofa* (7,1%), castor - *Castor fiber* (10,0%), lontra - *Lutra lutra* (4,0%) e lebre - *Lepus europaeus* (9,1%) (Figura 6) (Shimalov & Shimalov, 2000). A capacidade da espécie *F. hepatica* de se adaptar rapidamente a novas espécies de hospedeiros definitivos é ilustrada pelos exemplos do rato preto na ilha da Córsega (Valero *et al.*, 1998, 2002 e Mas-Coma *et al.*, 2003), da nútria em França (Menard *et al.*, 2001) e do porco nos países andinos (Mas-Coma *et al.*, 1997; Valero *et al.*, 2000 e Valero *et al.*, 2001a,b). Em todos estes casos, os hospedeiros recém-adquiridos (Figura 6) têm agora um papel importante como hospedeiros na transmissão da fasciolose, contribuindo para a expansão da doença, e devem, por conseguinte, ser tidos em conta na aplicação de medidas de controlo (Mas-Coma *et al.*, 2005).



**Figura 6:** Novos hospedeiros definitivos de *Fasciola* spp. A - *Alces alces* (alce), B- *Cervus elaphus* (veado vermelho), C - *Capreolus capreolus* (corça), D- *Sus scrofa* (javali), E - *Castor fiber* (castor), F - *Lutra lutra* (lontra), G - *Lepus europaeus* (lebre), (<http://www.google.pt/imgres?imgurl>).

## 2.5. Desenvolvimento da doença

A fasciolose animal ocorre em duas fases, no parênquima hepático e nas vias biliares (Behm & Sangster, 1999 e Nithiuthai *et al.*, 2004). Durante a fase no parênquima, a patologia é causada por danos nos tecidos durante a migração, e pode incluir danos graves no fígado e até mesmo resultar em morte. A fase biliar coincide com a presença do parasita nos ductos biliares, com sintomas decorrentes da acção de alimentação do parasita. Os sintomas podem também ocorrer como resultado da obstrução biliar e inflamação. Em humanos, poucos parasitas sobrevivem até à maturidade e a doença biliar é rara. No entanto, a fase biliar da doença é mais comum em ovinos, bovinos, coelhos, ratos e camundongos (Norbury, 2008).

A gravidade da doença pode ser classificada como aguda ou crónica. A patologia da fasciolose aguda ocorre quando é ingerido grande número de metacercárias num curto espaço de tempo. Usualmente isto não acontece, excepto em ovinos e caprinos. A forma crónica da doença é

mais comum em todos os hospedeiros, apesar de existir uma variação considerável entre os animais. Embora raramente fatal, é de considerável importância económica (Norbury, 2008).

Em geral, o nível de infecção afecta a patologia, no entanto, a gravidade da doença depende também do estado nutricional dos hospedeiros. Há também uma considerável variação na susceptibilidade à infecção e na resposta imune contra o parasita, com certos hospedeiros que possuem resistência inata contra uma ou ambas as espécies de *Fasciola* (Mulcahy *et al.*, 1999a).

A fasciolose humana segue um curso semelhante à fasciolose animal. As duas fases da infecção humana são denominadas aguda e crónica e, estão associadas à migração e à presença do parasita adulto nos ductos biliares, respectivamente. O género *Fasciola* parece não ter-se adaptado completamente ao homem, visto que, muitos parasitas ao migrarem para o parênquima hepático, ficam retidos e não chegam às vias biliares (Mas-Coma *et al.*, 1999b).

Uma complicação muitas vezes fatal na fasciolose, conhecida como *doença negra*, é causada pela infecção secundária por *Clostridium oedematiens* ou *C. novyi*. As bactérias proliferam nas lesões necróticas e causam hepatite. Além disso, em algumas regiões, particularmente no Médio Oriente, *Fasciola* spp pode causar uma condição conhecida como *halzoun*, parasitas imaturos, ingeridos com fígado cru, fixam-se às membranas bucal ou faríngea, causando dor, irritação, rouquidão e tosse (Bogitsh *et al.*, 2005).

## **2.6. Hospedeiros intermediários**

### **2.6.1. Hospedeiros intermediários originais e alternativos**

O tremátode *F. hepatica* tem como hospedeiro intermediário preferencial na Europa, o molusco *Galba (Lymnaea) truncatula*. Outras espécies de *Lymnaeidae* também podem ser encontradas a transmiti-lo em condições naturais tais como: *Omphiscola glabra*, *Lymnaea (Stagnicola) palustris palustris*, *L. (S.) p. turricula* e *Catascopia occulta*. Os principais moluscos hospedeiros intermediários da espécie *F. hepatica* em outros continentes são *L. truncatula* e

*Pseudosuccinea columella* em África; *Fossaria humilis*, *F. bulimoides* e *F. cubensis* na América do Norte; *F. cubensis* e *P. columella* na América Central; *F. viatrix*, *L. diaphana*, *F. cubensis* e *L. truncatula* na América do Sul; *L. truncatula* e *Austropeplea ollula* (= *A. viridis*) na Ásia; *L. tomentosa* na Austrália; *L. tomentosa*, *P. columella* e *L. truncatula* na Nova Zelândia e *A. ollula* no Hawaí, Papua Nova Guiné, Filipinas e Japão. Espécies de hospedeiros intermediários alternativas são *P. columella* no Norte e no Sul da América; *P. columella* e *A. ollula* na Austrália e *L. gedrosiana* no Irão (Bargues & Mas Coma, 1997 e Bargues *et al.*, 1997, 2001, 2003).

Para a espécie *F. gigantica*, os principais moluscos hospedeiros intermediários são *Radix* (*Lymnaea*) *natalensis* em África; *L. auricularia* no Médio Oriente, Extremo Oriente e nos estados do sul da Ex-URSS; *F. cubensis* na costa Norte do Golfo Americano; *L. rufescens* na Ásia e no subcontinente indiano; *L. rubiginosa* no Extremo Oriente e na Malásia; *L. swinhoei* no sudeste da Ásia e das Filipinas e *A. ollula* no Hawaí e Japão. Espécies hospedeiras alternativas são *L. truncatula* em África; *L. caillaudi* no Egipto; *L. peregra* no Próximo Oriente, Médio Oriente e nos estados do sul do Ex-URSS; *L. gedrosiana* no Irão; *L. euphratica* no Iraque; *L. luteola* no Nepal; *L. bactriana*, *L. tenera* e *L. subdisjuncta* no Turcomenistão; *P. columella* na América do Norte e *A. ollula* no Extremo Oriente (Bargues & Mas-Coma, 1997 e Bargues *et al.*, 2001).

As diferentes especificidades dos tremátodes *F. hepatica* e *F. gigantica* são epidemiologicamente muito importantes, devido às diferentes exigências dos aspectos ecológicos das respectivas espécies de hospedeiros intermediários *Galba*/*Fossaria* e *Radix*. Os moluscos do género *Lymnaea* que transmitem *F. hepatica* são espécies que mostram marcadas tendências anfíbias e que normalmente habitam pequenas colecções de água, tais como as colecções de água temporárias dependendo da chuva sazonal. As espécies de *Lymnaea* responsáveis pela transmissão de *F. gigantica* preferem grandes e profundos colecções de água, rica em vegetação aquática, tipicamente de água permanente. Assim, os focos de transmissão das duas espécies de *Fasciola* geralmente são diferentes e aparecem separados, mesmo na mesma localidade endémica, e a fasciolose por *F. hepatica* está mais relacionada com a sazonalidade do que a fasciolose por *F.*

*gigantica*. No entanto, as excepções são encontradas em áreas hiperendémicas humanas, tais como as que estão em altitudes muito elevadas, onde *L. truncatula* está associada a colecções de água permanentes, devido às altas taxas de evapotranspiração (evaporação e transpiração) (Mas-Coma *et al.*, 1999c).

### 2.6.2. Difusão e adaptação de *Fasciola* spp/*Lymnaea* spp

A expansão do tremátode *F. hepatica* da Europa (sua área de origem) para os outros continentes, está também relacionada com: (i) expansão geográfica do seu hospedeiro intermediário *Galba (Lymnaea) truncatula* originária da Europa, (ii) a expansão da espécie americana *Pseudosuccinea columella*, e (iii) a sua adaptação a outras espécies de *Lymnaea* autóctones de áreas recém-colonizadas. A menor distribuição geográfica da espécie *F. gigantica* parece estar relacionada à fraca capacidade de difusão de seus moluscos hospedeiros intermediários, *Radix (Lymnaea) natalensis* africano e *Radix (Lymnaea) auricularia* da Eurásia (Mas-Coma *et al.*, 2005).

A espécie de molusco europeia *G. truncatula* provavelmente expandiu-se para os outros continentes, juntamente com a exportação comercial de animais (inseridos na lama nas patas de ovinos e bovinos). A capacidade de expansão de *G. truncatula* também está relacionada com a sua capacidade de alargar o seu nicho ecológico, como observado na ilha da Córsega no Mediterrâneo (Gil-Benito *et al.*, 1991). Esta grande ilha é muito montanhosa e as suas condições climáticas (chuvas e temperatura) tornam difícil compreender porque é que a fasciolose é endémica em toda a ilha. Efectivamente, alguns estudos malacológicos mostraram que *G. truncatula* encontra-se distribuída por toda a periferia insular (zonas costeiras), bem como nas regiões do interior da ilha, a uma altitude de até 1.500 m. Os seus habitats em Córsega podem ser classificados em dois tipos diferentes: habitat reservatório (presença permanente e renovação de água) e habitats de invasão (com presença sazonal de água). De um ponto de vista ecológico, os diferentes biótopos podem ser distinguidos como: de grandes a pequenos rios, de naturais (rios, colecções de água, zonas de inundação, planícies de pastagem), a habitats artificiais (reservatórios de água de grandes

dimensões, canais de irrigação, mananciais, bebedouros para animais de diferentes tipos, valas de estrada) (Oviedo *et al.* 1996). A ocupação de diversos habitats atípicos pode ser considerada como o alargamento do nicho ecológico, que por sua vez está relacionado com a ampla distribuição da doença na ilha (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Outra espécie de *Lymnaea* relacionada com a expansão da fasciolose é *P. columella*. Esta espécie é uma ótima colonizadora aquática, tolerante ao calor e que se pensa ser originária da América Central, do Caribe e da parte sul da América do Norte. Hoje está presente na América do Sul, Europa, África, Austrália, Nova Zelândia e mesmo no Tahiti. No Brasil por exemplo, *P. columella* parece ser a única espécie de *Lymnaea* presente em muitas áreas de fasciolose. Curiosamente, uma linhagem de *P. columella* resistente à infecção por *Fasciola* spp foi detectada recentemente em Cuba, onde a fasciolose é transmitida por *F. cubensis* e *P. columella* (Gutierrez *et al.*, 2003a,b e Fernandez *et al.*, 2004). Esta descoberta abre oportunidades de pesquisa para procurar os genes responsáveis pela resistência e futura aplicação em estratégias de controlo (Mas-Coma *et al.*, 2005).

O tremátode *F. hepatica* utilizou diferentes espécies de moluscos da família *Lymnaeidae* como hospedeiros intermediários para expandir-se pelas Américas, Ásia, Hawaí, Papua Nova Guiné, Filipinas, Japão, Austrália e Nova Zelândia (Mas-Coma & Bargues, 1997 e Bargues *et al.*, 2001). Relatos de outros limneídeos (*L. palustris*, *L. turricula*, *Omphiscola glabra*, *Catascopia occulta*, *Radix ovata*) e planorbídeos (*Planorbis leucostoma*), espécies hospedeiros intremediários naturais alternativos ou facultativos para a transmissão de *F. hepatica* na Europa são extremamente raros, como tal, só existe uma oportunidade quando a infecção dos limneídeos ocorre durante os primeiros dias de vida do molusco (Dreyfuss *et al.*, 1994; Bargues *et al.*, 2001 e Dreyfuss *et al.*, 2002). No laboratório, as espécies *O. glabra*, *L. palustris* e *L. fuscus* e mesmo *L. stagnalis*, *R. peregra* e *Myxas glutinosa* podem ser infectadas se o miracídio penetrar em moluscos muito jovens, apesar do índice de mortalidade ser elevado (Oviedo *et al.*, 1996 e Dreyfuss *et al.* 2000, 2002). No

Egipto, a descoberta do planorbídeo *Biomphalaria alexandrina* infectado naturalmente por *F. gigantea* exige confirmação (Farag & El Sayad, 1995).

### 2.6.3. Classificação e genotipagem de *Lymnaea* spp

Os conhecimentos actuais sobre a genética de *Lymnaeidae* e interrelações entre *Lymnaea* spp/*Fasciola* spp estão longe de terminar, principalmente por: (i) esta família de moluscos estar sujeita a uma sistemática e taxonomia confusa; (ii) numerosos *Lymnaeidae* mostrarem uma uniformidade morfológica e anatómica inter-específica, que muitas vezes cria sérias dificuldades na classificação de exemplares ao nível da espécie; (iii) a variação intra-específica da forma da concha ser particularmente bem marcada nos *Lymnaeidae* (Bargues *et al.*, 2001). Há ainda, necessidade de outras ferramentas moleculares que permitam a distinção de espécies e caracterização da população (Mas-Coma *et al.*, 2005).

A electroforese de isoenzimas, ADN microssatélites e RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) podem ser úteis a nível da população, mas os marcadores de uma sequência específica de ADN provaram ser o melhor método. A subunidade ribossomal grande (16S) do ADN mitocondrial torna possível distinguir entre as várias espécies *Lymnaea* e analisar suas relações filogenéticas, mas não tem sido utilizada para clarificar a sistemática e taxonomia dos *Lymnaeidae* (Mas-Coma *et al.*, 2005).

O gene 18S do ARN ribossomal nuclear poderia ser usado para diferenciar entre as espécies pertencentes a diferentes géneros e subgéneros, e às vezes entre as espécies de mesmo género. No entanto, não é útil quando se faz comparações entre populações da mesma espécie (Bargues & Mas-Coma, 1997 e Bargues *et al.*, 1997).

A maioria das informações valiosas usadas para esclarecer aspectos sistemáticos e taxonómicos e caracterização genética de populações de *Lymnaeidae*, têm sido obtidas do estudo das sequências de ITS rDNA nuclear. ITS-2 tem sido o marcador molecular mais frequentemente utilizado e parece ser uma ferramenta útil para resolver relações intra-específicas e específicas nas



populações de *Lymnaeidae* e também parece ser um excelente marcador para fins de sistemática e taxonomia (Bargues *et al.*, 2001; Mas-Coma *et al.*, 2001 e Bargues *et al.*, 2003). O ITS-1 rADN tem sido utilizado em menor escala e pode oferecer mais informações a nível da população do que o ITS-2 (Bargues *et al.*, 2005).

Muito recentemente, mutações de nucleotídeos em ITS-2 e ITS-1, têm-se mostrado úteis para distinguir populações da espécie *P. columella* susceptíveis e resistentes à infecção por miracídios de *F. hepatica* em Cuba (Gutierrez *et al.*, 2003b).

## **2.7. Ecologia e Epidemiologia**

A ecologia do parasita *Fasciola* está estreitamente ligada à dos moluscos *Lymnaeidae* que lhe servem de hospedeiros intermediários. As características geográficas e os factores climáticos determinam o ritmo da reprodução dos moluscos do género *Lymnaea* e, por conseguinte, a dinâmica populacional. Os moluscos do género *Lymnaea* e as formas imaturas de *Fasciola* spp podem ser encontrados em pastagens nas mais diversas partes do mundo, desde aquelas situadas ao nível do mar até as situadas em vales andinos a mais de 3700 m de altitude (Acha & Szyfres, 1986).

Do ponto de vista ecológico, os habitats dos moluscos do género *Lymnaea* podem dividir-se em dois grandes grupos: os denominados de focos primários (reservatórios) e aqueles denominados de áreas de disseminação. Os focos primários são locais permanentemente húmidos, como pequenos cursos de água, lagos, canais, áreas de campos alagados, onde os moluscos se reproduzem de modo constante. Nestes locais, a população de moluscos mantém-se uniforme, com uma densidade populacional baixa (Acha & Szyfres, 1986).

As áreas de disseminação são aquelas onde se alternam inundações e secas, e são de especial interesse epidemiológico. São ambientes de disseminação dos focos primários originais, e contêm grandes concentrações de *Lymnaea* spp (Acha & Szyfres, 1986).

Os moluscos *Lymnaeidae* podem ter origem directamente dos focos primários, levados pelas águas de enchentes, ou da reactivação dos moluscos que ficaram em latência durante os períodos de

seca. As chuvas (ou a irrigação), depois de um período seco, criam condições favoráveis nestes campos para a reprodução dos mesmos (Acha & Szyfres, 1986).

Os habitats temporários ou de extensão são as pastagens alagadas, as quais constituem áreas enzoóticas onde ocorrem surtos graves de fasciolose animal. Os surtos de fasciolose aguda são raros no inverno em climas temperados, mas podem também ocorrer depois das chuvas de fins de verão e Outono quando sucedem a um período seco (Acha & Szyfres, 1986).

Pelo efeito da humidade e da temperatura, um grande número de cercárias abandona os moluscos e vai-se enquistar sobre a superfície dos vegetais que compõe as pastagens. Nestas condições, os animais herbívoros podem-se infectar com um grande número de metacercárias e, em aproximadamente seis a oito semanas, sofrer a forma aguda da parasitose. A fasciolose crónica ocorre mais tarde, a partir de fins do Outono. Em anos chuvosos, pode haver metacercárias em grandes extensões das pastagens (Acha & Szyfres, 1986).

A ecologia do molusco também não é sempre uniforme. Foi estudada a dinâmica populacional do molusco *L. columella* por um período de seis anos, em pastagens de fazendas de exploração leiteira infectadas por *F. hepatica*. A pesquisa foi desenvolvida nos municípios de Piquete e Redenção da Serra, São Paulo, Brasil. Os resultados obtidos foram diferentes em cada fazenda, revelando que a dinâmica da população de moluscos está estreitamente relacionada com factores ecológicos e climáticos. No município de Piquete, o aumento da variação da densidade populacional flutuou em relação inversa à temperatura e à pluviosidade, encontrando-se maior número de moluscos no período seco do ano (Maio - Outubro). No município de Redenção da Serra, a grande quantidade de matéria orgânica observada no biótopo foi responsável pela captura do maior número de moluscos no período de altas temperaturas e alta densidade pluviométrica (Janeiro - Março) (El-Kouba, 2005).

O hospedeiro definitivo mais importante deste helminta é o ovino. Segundo estimativas (Boray, 1969), um ovino que sofre de uma infecção sub-clínica leve pode contaminar diariamente o campo com mais de meio milhão de ovos e, em casos de infecção moderada, com 2,5 a três milhões

de ovos por dia. O bovino segue, em importância, ao ovino, mas a produção de ovos pelo parasita *Fasciola* declina com rapidez. Muitas outras espécies de herbívoros domésticos e silvestres, entre eles, os lagomorfos, podem servir como hospedeiros definitivos. De acordo com estudos realizados na Austrália, alguns destes animais limitam-se a representarem o papel de hospedeiros temporários e, por esta razão, não mantêm o ciclo por muito tempo; tal seria o caso dos coelhos silvestres, que contaminam as pastagens de modo insignificante (Boray, 1969, citado por El-Kouba, 2005).

O Homem infecta-se sobretudo, pela ingestão de saladas de agrião (*Nasturtium officinale*) que contêm metacercárias aderidas à superfície da planta. Em certas ocasiões, podem servir como fonte de infecção humana a alface e outros vegetais contaminados quando consumidos crus, a água de canais de irrigação e de outros receptáculos onde existam metacercárias (El-Kouba, 2005).

Foram estabelecidos três tipos de situações nas áreas endêmicas de fasciolose humana (Mas-Coma *et al.*, 1999a):

- 1) Área hipoendêmica, com uma prevalência inferior a 1%, carga parasitária média inferior a 50 ovos por grama de fezes (epg);
- 2) Área mesoendêmica, com uma prevalência de 1-10%, carga parasitária média de 50-300 epg;
- 3) Área hiperendêmica, com uma prevalência superior a 10%, carga parasitária média geralmente superior a 300 epg.

A classificação epidemiológica inclui também situações de (i) casos importados (casos humanos diagnosticados em zonas livres de fasciolose, que foram infectados numa zona de transmissão de fasciolose) e (ii) casos autóctones, isolados, não constantes (casos humanos esporádicos em uma área endêmica de fasciolose animal), bem como situações epidêmicas, com (iii) epidemias nas áreas endêmicas de fasciolose animal (surto que aparecem nas zonas onde relatos humanos anteriores sempre foram esporádicos) e (iv) epidemias em áreas hipo, meso e hiperendêmicas para humanos (maior número de indivíduos podem estar envolvidos, geralmente

relacionadas com as condições climáticas anteriores, favorecendo a transmissão) (Mas-Coma, 2004).

O Norte do Altiplano Boliviano mostra as maiores prevalências e cargas parasitárias conhecidas: prevalências em algumas comunidades de até 72% e 100% em inquéritos coprológicos e serológicos, respectivamente (Hillyer *et al.*, 1992; Mas-Coma *et al.*, 1995; Esteban *et al.*, 1997a, 1997b, O'Neill *et al.*, 1998; Esteban *et al.*, 1999 e Mas-Coma *et al.*, 1999c), e cargas parasitárias superiores a 5000 epg em crianças (Esteban *et al.*, 1997a, 1997b e 1999). Apesar da fasciolose ser mais prevalente e manifestar-se de forma mais intensa em crianças (com um pico na faixa etária dos 9-11 anos), indivíduos adultos também são infectados com prevalências superiores a 40% e carga parasitária média de até 752 epg (Esteban *et al.*, 1997a, 1997b e 1999). Alguns indivíduos adultos, mantêm os parasitas adquiridos quando jovens ou podem ser infectados por causa do risco elevado de infecção (Esteban *et al.*, 1999). Apesar de ser a um nível inferior, situações semelhantes de prevalência e carga parasitária foram encontradas em outros países andinos (Peru) e africano (Egipto) (Esteban *et al.*, 2002 e 2003).

O efeito de género na fasciolose é notável. Prevalências e/ou cargas parasitárias em áreas hiperendémicas para humanos parecem ser significativamente maiores no sexo feminino. Nos países andinos, as mulheres eliminam significativamente mais ovos do que os homens (Esteban *et al.*, 1999 e 2002), e no Egipto, a prevalência parece ser significativamente maior nas mulheres do que nos homens (Esteban *et al.*, 2003). Em países andinos, porém, as prevalências não diferem entre os sexos (Esteban *et al.*, 1999 e 2002).

Várias áreas hipo e hiperendémicas para humanos nas Américas, Europa, África e Ásia, apresentam um espectro muito amplo de características epidemiológicas relacionadas com a grande diversidade de ambientes (Mas-Coma *et al.*, 2003). Nas áreas endémicas para a fasciolose humana, a distribuição do parasita *Fasciola* spp parece irregular e, a prevalência da parasitose parece estar relacionada com a distância às colecções de água que possuem os moluscos *Lymnaeidae* (Mas-Coma *et al.*, 1999c).

Uma análise global da distribuição geográfica de casos humanos mostra que a correlação esperada entre a fasciolose animal e humana só aparece a um nível básico. As mais altas taxas de prevalências em humanos não estão necessariamente relacionados com as áreas onde a fasciolose é um grande problema veterinário. Segundo Esteban *et al.*, (1998), os principais problemas de saúde são conhecidos nos países andinos (Bolívia, Peru, Chile e Equador), no Caribe (Cuba), norte de África (Egipto), Médio Oriente (Irão e países vizinhos) e na Europa Ocidental (Portugal, França e Espanha).

## **2.8. As espécies de *Fasciola* e suas distribuições**

As duas principais espécies, *F. hepatica* (Linnaeus, 1758) e *F. gigantica* (Cobbold, 1856) são os agentes etiológicos da fasciolose em ruminantes e em seres humanos no mundo inteiro (Walker *et al.*, 2008). São dependentes de um conjunto consistente de condições ambientais adequadas para sobreviver. Estas espécies exigem humidade e condições aceitáveis de temperatura, tanto para os hospedeiros intermediários como para seu próprio crescimento e desenvolvimento (Norbury, 2008).

A espécie *F. hepatica* tem um leque mais amplo de distribuição e é considerada cosmopolita (Europa, Américas, Ásia, Austrália, Nova Zelândia e alguns países do norte africano, bem como regiões montanhosas e zonas mais frias do Paquistão, Quênia e África do Sul) enquanto a espécie *F. gigantica* está largamente confinada às zonas temperadas e aos trópicos (Europa do Sul, sul e sudeste da Ásia e difundida em quase toda a África, com exceção de algumas zonas áridas), mas as suas distribuições geográficas sobrepõem-se, em muitos países africanos e asiáticos e, por vezes, no mesmo país, embora em tais casos, a exigência ecológica dos parasitas e dos seus moluscos hospedeiros intermediários sejam distintas (Figura 7) (Pantelouris, 1965; Malek, 1980; Soulsby, 1982; Mas-Coma *et al.*, 2005 e Norbury, 2008).

Como já se referiu, a espécie *F. hepatica* normalmente ocorre em todo o mundo em regiões temperadas, já a espécie *F. gigantica* provoca surtos em áreas tropicais do sul da Ásia, Sudeste da Ásia e África. A infecção é mais prevalente nas regiões com ovinos e produção intensiva de gado

(WHO, 2007). No Egipto, tanto *F. gigantica* como *F. hepatica* co-existem em animais domésticos (Lotfy & Hillyer, 2003; Dar *et al.*, 2005; WHO, 2007 e Periago *et al.*, 2008). A primeira tem estado presente desde os tempos dos faraós, enquanto a última foi importada da Europa no início da década de noventa do século passado.

Embora ambas as espécies sejam endémicas em muitos países, *F. hepatica* frequentemente predomina em altitudes mais elevadas, devido à sua menor exigência relativamente à temperatura (Norbury, 2008).

Apesar da importância de se diferenciar entre a infecção por uma ou outra espécie de *Fasciola*, devido às suas distintas características epidemiológicas, patológicas e de controlo, não há, infelizmente, nenhum teste coprológico directo nem imunológico indirecto disponíveis para o diagnóstico (Periago *et al.*, 2008). A diferenciação específica só pode ser feita por estudo morfológico dos vermes adultos ou através de testes moleculares (Periago *et al.*, 2008).

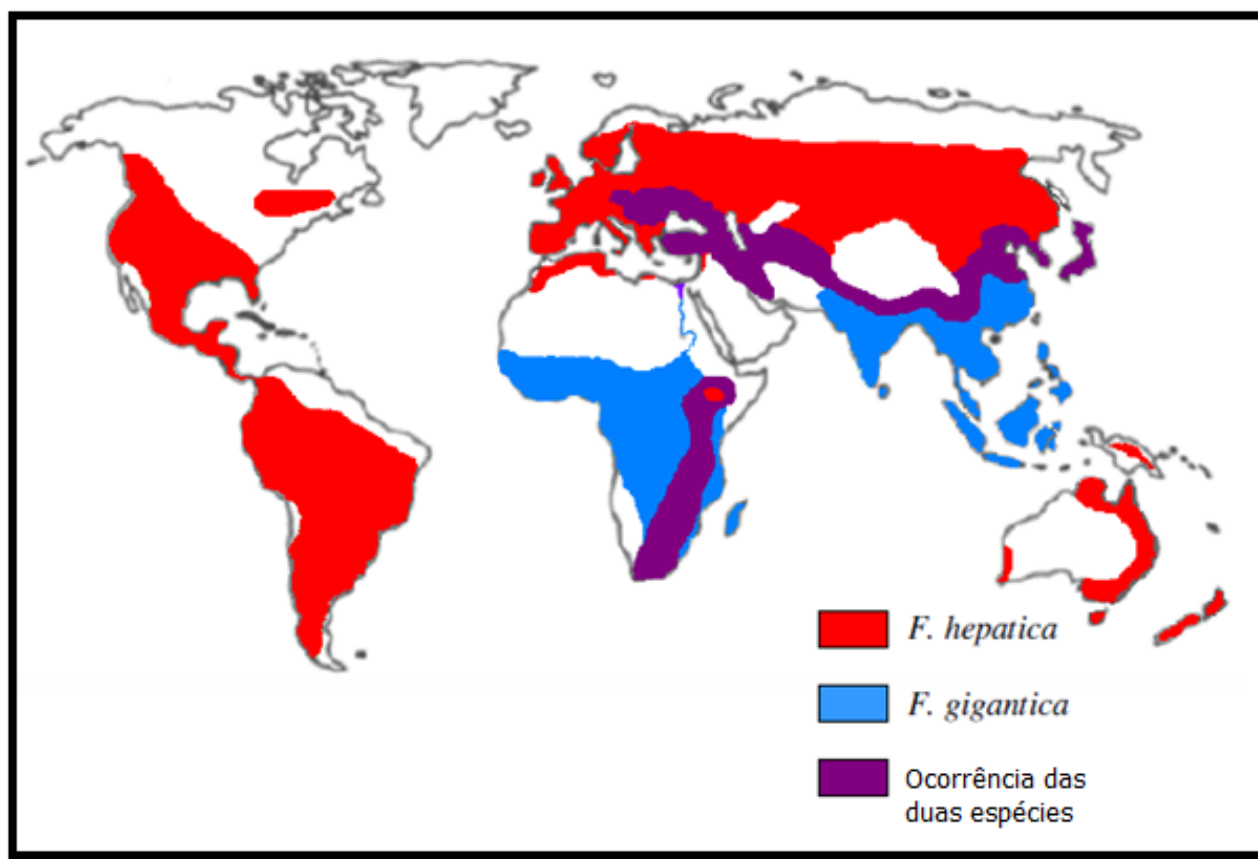
Acredita-se que o parasita *F. hepatica* tenha origem europeia, com *G. truncatula* como a espécie hospedeiro intermediário original. A fasciolose tem um grande poder expansivo devido à grande capacidade de colonização dos seus agentes etiológicos e das espécies hospedeiros intermediários (Mas-Coma *et al.*, 2003). Assim, a espécie *F. hepatica* foi capaz de expandir-se e hoje está presente na Europa, África, Ásia, Américas e Oceania. Por outro lado, a espécie *F. gigantica* parece não ter tal poder de colonização e a sua distribuição geográfica mostra ser contínua abrangendo África e Ásia e, em menor extensão, o sul da Europa, Turquia, Médio Oriente e, alguns estados do sul da antiga União Soviética, nomeadamente a Arménia (Mas-Coma & Bargues, 1997). Na América do Norte, embora esporadicamente mencionada há muito tempo atrás, não tem sido citada nas últimas décadas (Price, 1953).

Na África Oriental, a espécie *F. gigantica* é geralmente o agente etiológico da fasciolose, mas tem havido relatos da espécie *F. hepatica* em bovinos de regiões montanhosas do Quénia, Etiópia, Uganda e Zaire. A topografia das regiões montanhosas do sul da Tanzânia, oferece um ambiente onde existem as condições climáticas capazes de permitir a existência das espécies *F. hepatica* e *F.*

*gigantica*. Teoricamente, isso permitiria a interacção entre as espécies de *Fasciola* e a possível criação de híbridos (Walker *et al.*, 2008).

No trabalho realizado por Walker *et al.*, (2008) no sul da Tanzânia, os autores confirmaram a existência do molusco *L. truncatula* (Muller, 1774) no Planalto Kitulo das regiões montanhosas do Sul da Tanzânia, onde a altitude é elevada, juntamente com os dados morfométricos e moleculares confirmando a presença da espécie *F. hepatica* na área correspondente. Em altitudes inferiores, onde as condições climáticas foram desfavoráveis para a existência de *L. truncatula*, a presença da espécie *L. natalensis* (Krauss, 1848) foi confirmada por dados moleculares, juntamente com o parasita *F. gigantica*. Uma análise baseada na sequência 618 bp do gene 28S rARN, não revelou a presença de híbridos de *Fasciola*.

Actualmente, a fasciolose apresenta a mais ampla distribuição em termos de latitude, longitude e altitude, conhecida entre as doenças parasitárias transmitidas por hospedeiros intermediários, principalmente devido a espécie *F. hepatica* (Mas-Coma *et al.*, 2003).



**Figura 7:** Distribuição mundial das espécies de *Fasciola* (adaptado de Torgerson & Claxton, 1999).

## 2.9. Interacção parasita-hospedeiro

As espécies de *Fasciola* são capazes de sobreviver por longos períodos dentro do hospedeiro, estando relativamente protegidos do sistema imunológico do hospedeiro, enquanto estiverem nos ductos biliares. No entanto, durante a migração dos parasitas imaturos, estes deparam-se com várias respostas do sistema imune do hospedeiro e utilizam uma variedade de moléculas para ajudar a ultrapassar barreiras defensivas, evitando e modulando o sistema imune do hospedeiro (Norbury, 2008).

A infecção parasitária é frequentemente acompanhada por uma baixa regulação da imunidade mediada por células (Cervi *et al.*, 1996; Allan & MacDonald, 1998 e Dzik, 2006), e está bem documentada que as infecções por helmintas e *Fasciola* spp em particular, causam supressão da resposta Th1 e induzem uma resposta imune Th2, a qual activa as células B, levando à produção de anticorpos (Scott *et al.*, 1989; Spithill *et al.*, 1997; O'Neill *et al.*, 2000; Cervi *et al.*, 2004; Kamal & El Sayed, 2006 e Jayraw *et al.*, 2009).

Apesar das espécies de *Fasciola* possuírem uma grande variedade de mecanismos de evasão imune e técnicas de modulação, existem diferenças entre as duas espécies em relação à sua eficácia em diferentes hospedeiros, como demonstrado pela diferente susceptibilidade observada em certos hospedeiros. A relativa resistência dos ovinos da Indonésia contra a espécie *F. gigantica* em relação à espécie *F. hepatica* é um exemplo (Roberts *et al.*, 1996 e Piedrafita *et al.*, 2007).

A resposta humoral nas infecções pelo parasita *F. gigantica*, de um modo geral, inicia-se com produção do anticorpo IgM, a partir do 10º dia após a infecção e mostra um pico na 12ª, com um decréscimo por volta da 13ª semana após a infecção. A partir da 15ª semana o nível de IgM vai diminuindo até não ser mais possível a sua detecção. A produção do anticorpo IgG inicia-se mais tarde, a partir da segunda semana após a infecção, com tendência para aumentar, atingindo o pico na 13ª semana após a infecção e, a partir da 14ª semana, o nível do anticorpo diminui e mantém-se durante a infecção (Jayraw *et al.*, 2009).



## **2.10. Patologia**

A patogenia causada pelo tremátode *F. gigantica* tem sido considerada semelhante à da espécie *F. hepatica* visto terem ciclos de vida semelhantes nos hospedeiros definitivos. Além disso, a migração de vermes imaturos das duas espécies causam danos semelhantes no parênquima hepático e os vermes adultos no ducto biliar. No entanto, as informações sobre a patogenia de *F. gigantica* são relativamente limitadas para apoiar ou refutar esta hipótese. Tem sido considerado, a existência de diferentes repercussões do parasitismo pelas duas espécies de *Fasciola*, uma vez que *F. gigantica*, tem capacidade para causar mais danos, como consequência da sua maior dimensão e maior migração no fígado, relativamente à *F. hepatica* (Molina, 2005).

A fasciolose é uma doença de alta patogenicidade. Nos humanos, a patogenia depende do número de parasitas e parece ser semelhante à descrita em animais (Chen & Mott, 1990; Mas-Coma & Bargues, 1997 e Mas-Coma *et al.*, 1999a, 2000).

A gravidade desta parasitose está condicionada pelo número de metacercárias ingeridas, pela idade do hospedeiro, pela espécie e estado geral do hospedeiro afectado. Por exemplo, nos ovinos infectados com 200 metacercárias, a doença evolui com sintomas clínicos acentuados, enquanto que em animais infectados com 2000 metacercárias, a morte ocorre em 4 a 8 semanas (Vignau *et al.*, 2005).

Os bovinos são menos susceptíveis do que os ovinos, assim 1000-5000 metacercárias produzem fasciolose aguda em bezerros de 6-8 meses, mas em adultos não. Tanto os bovinos como os ovinos resistem menos à infecção se estiverem mal alimentados ou afectados por outras parasitoses (Vignau *et al.*, 2005).

Apesar de existir uma diminuição da prevalência em crianças e indivíduos jovens em relação aos adultos, os resultados demonstram que, em zonas endémicas os indivíduos adultos mantêm os parasitas que adquiriram quando jovens ou são re-infectados, como consequência de habitarem em zonas de alto risco de infecção (Esteban *et al.*, 1999). Deve-se considerar que a longevidade do

parasita adulto no Homem é entre 9 e 13,5 anos (Chatterjee, 1975 e Dan *et al.*, 1981). Esta situação sugere que nessas áreas, a maioria dos indivíduos adultos deve estar na fase crónica e, lesões agudas por infecções repetitivas estarão sobrepostas à doença crónica com relativa frequência. Assim, a fase aguda pode ser prolongada e sobreposta com as fases latente e obstrutiva (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Têm sido utilizados ratinhos para a investigação patológica no período crónico avançado da fasciolose (Valero *et al.*, 2000 e 2003). Assim, em ratos *Wistar* (ratos brancos) experimentalmente infectados com *F. hepatica*, a presença de cálculos biliares aumenta com o tempo de infecção, e a indução litogénica por este parasita torna-se evidente em situações de estado avançado de cronicidade até 100 dias após a infecção (p.i.). O risco relativo de cálculo biliar aumenta quando o número de vermes por animal aumenta. A presença de cálculo biliar está fortemente associada com o número de parasitas localizados nos ductos biliares e com alta densidade de níveis de lipoproteínas e triglicerídeos no soro. O risco de cálculos biliares parece depender principalmente de factores que favorecem a obstrução dos ductos biliares (colangite, desenvolvimento do parasita em função do tempo e intensidade de infecção). Situações de casos não diagnosticados, como em indivíduos apresentando sintomas indistinguíveis ou aqueles que mantêm a infecção por um longo período de tempo devido a ausência de tratamento ou re-infecções repetitivas, geralmente em áreas endémicas humanas de países em desenvolvimento, implica um maior risco de litíase. O alto risco de cálculos biliares pode ser esperado em indivíduos que habitam áreas hiperendémicas, onde a eliminação de grandes quantidades de ovos nas fezes detectada em seres humanos sugere que a carga parasitária de *Fasciola* spp também pode ser muito alta (Valero *et al.*, 2003).

A capacidade das espécies de *Fasciola* para co-infectar com outros agentes patogénicos é bem conhecida. As respostas imunológicas aos antígenos do agente patogénico são marcadamente suprimidas e as infecções concomitantes são exacerbadas após a fasciolose (Brady *et al.*, 1999). Curiosamente, o espectro parasitológico de espécies de protozoários e helmintas encontrado na população das áreas endémicas de fasciolose humana, o poliparasitismo, e as associações entre a

fasciolose e outras parasitoses, parecem ser semelhantes em diferentes zonas endêmicas humanas (Esteban *et al.*, 1997a, b, 1999, 2002 e 2003). Estas associações sinérgicas da fasciolose com outros agentes patogênicos parecem estar na base da alta taxa de morbidade e mortalidade de crianças que habitam no Norte do Altiplano Boliviano (Mas-Coma *et al.*, 1995).

## **2.11. Diagnóstico**

Várias técnicas têm sido utilizadas para o diagnóstico desta importante parasitose, entre elas destacam-se os métodos directos e indirectos. A técnica directa, mais simples, é a observação do parasito adulto nos ductos biliares dos animais mediante necrópsia e inspecção pós morte. Nas demais técnicas directas, o objectivo é colocar em evidência o ovo do parasita (exame coproparasitológico). No início do século XX foram desenvolvidas técnicas baseadas no princípio de sedimentação fecal de Hoffmann *et al.*, (1934). Todavia, estas técnicas têm baixa sensibilidade e só são capazes de pôr em evidência a parasitose apenas após o parasita ter completado o seu ciclo. Nos anos 80 do século passado, Girão e Ueno (1985) padronizaram a técnica de tamização para a pesquisa de ovos. Contudo, apesar de melhorar a sensibilidade, a técnica só é capaz de detectar ovos após o parasita ter migrado pelo parênquima hepático (Queiroz, 2005).

Vários métodos de detecção serológica, incluindo ELISA e *Western Blot* têm sido desenvolvidos em busca de um método confiável, eficaz e de baixo custo para o diagnóstico. O diagnóstico de rotina para os seres humanos baseia-se na detecção de ovos nas fezes ou na aplicação de testes serológicos (Rim *et al.*, 1994).

As técnicas indirectas foram desenvolvidas a partir dos anos noventa (séc. XX), através da pesquisa de anticorpos produzidos contra qualquer fase do parasita *Fasciola*, ou pesquisa de antígenos parasitários. As técnicas de pesquisa de anticorpos mais utilizadas até ao presente são a imunofluorescência indirecta, imunoeletrotransferência (EITB), radioimunoensaio e a técnica de diagnóstico imunoenzimático *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que se caracterizam por alta sensibilidade, especificidade, rapidez e economia. Na maioria das aplicações, a técnica de

ELISA é comparável e até superior às técnicas de diagnóstico anteriormente citadas (Queiroz, 2005). Uma das grandes vantagens que apresenta é a possibilidade de estudar grandes populações em um curto prazo, sem precisar de instalações caras (Zubieta, 2003).

Técnicas parasitológicas directas, técnicas imunológicas indirectas e outras técnicas de diagnóstico não invasivas, são actualmente utilizadas no diagnóstico da fasciolose humana. Novos dados biológicos enfatizam a importância da análise coprológica quantitativa em inquéritos epidemiológicos, bem como no acompanhamento pós tratamento (e pós-vacinação, futuramente). Além da pesquisa de ovos nas análises coprológicas, vermes adultos e ovos podem também ser encontrados em outros órgãos locais por meio de outras técnicas invasivas como: a obtenção de fluido duodenal, gástrico e secreção biliar; cirurgia (laparotomia, colecistectomia e esfínterectomia); exame histológico do fígado e/ou materiais de biópsia de outros órgãos. Técnicas serológicas, como a intradermoreação e testes de detecção de antígenos nas fezes foram desenvolvidos e utilizados (Esteban *et al.*, 1998 e Hillyer, 1999).

Técnicas imunológicas fornecem vantagens de ser aplicáveis em todas as fases da doença, mas especialmente durante a fase aguda ou invasiva, e em outras situações em que as técnicas coprológicas são inadequadas. Por outro lado, as técnicas imunológicas apresentam outros problemas relacionados com a baixa especificidade. Vários testes serológicos têm sido utilizados para o diagnóstico da fasciolose humana. Quase todas estas técnicas dizem respeito à detecção de anticorpos circulantes e poucas são concebidas para detectar antígenos circulantes e imuno-complexos. Recentemente, diversas técnicas serológicas mostraram-se úteis para o acompanhamento da evolução pós-tratamento. Técnicas de diagnóstico não invasivas, que podem ser usadas para o diagnóstico da fasciolose humana são, a radiologia, radioisótopo de digitalização, ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (Esteban *et al.*, 1998 e Hillyer, 1999).

### **2.11.1. Diagnóstico diferencial entre as duas espécies de Fasciola**

O diagnóstico diferencial entre as espécies *F. hepatica* e *F. gigantica* nos humanos não pode ser alcançado através de exames clínicos, patológicos, coproparasitológicos ou imunológicos. Este é um problema nas áreas de sobreposição das duas espécies, por isso, o diagnóstico diferencial é muito importante devido às diferentes características patológicas, de transmissão e epidemiológicas das duas espécies de *Fasciola*. Para distinguir entre *F. hepatica* e *F. gigantica*, uma simples e rápida PCR- *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), utilizando enzimas de restrição comuns *Ava* II e *Dra* II, foi recentemente descrita. É baseada numa sequência de 618-bp do rRNA 28S, que fornece resultados claros e pode ser útil para o diagnóstico individual e levantamentos epidemiológicos em regiões endêmicas para humanos e animais (Marcilla *et al.*, 2002). Uma técnica semelhante de PCR-RFLP utilizando endonucleases de restrição *Hsp92* II e *Rca* I foi recentemente aplicada para diferenciar espécies de *Fasciola* na China (Huang *et al.*, 2004).

### **2.11.2. Testes serológicos – aumento da sensibilidade e especificidade**

Muitos esforços têm sido centrados na obtenção de antígenos de E/S (excreção/secreção) purificados e/ou moléculas recombinantes para melhorar os testes serológicos, pois o diagnóstico parasitológico tem algumas desvantagens, tais como: falsos negativos quando utilizado na fase aguda da doença, visto que, o exame parasitológico de fezes só é positivo após 3-4 meses, dinâmica de produção de ovos intermitente, eliminação de ovos em pouca quantidade ou mesmo ausência nos casos com apenas um ou alguns parasitas adultos, infecções crônicas, infecções ectópicas ou ainda falsos positivos relacionados com ovos em trânsito após a ingestão de fígados de animais domésticos infectados, ou parasitas incapazes de atingir a maturidade em seres humanos em áreas não endêmicas para humanos (Esteban *et al.*, 1998 e Mas-Coma *et al.*, 1999b).

Proteases de cisteína são provavelmente as proteínas mais abundantes entre os produtos de E/S de *Fasciola* spp e mostraram ser uma valiosa fonte de antígenos para o diagnóstico. Estas enzimas são secretadas pelas formas adultas e jovens (Dalton *et al.*, 2003 e Law *et al.*, 2003) e são

altamente antigénicas em animais (Cornelissen *et al.*, 1999, 2001 e Neyra *et al.*, 2002) e em humanos (Cordova *et al.*, 1997). Diversas proteases de cisteína oferecem marcadores bastante sensíveis e específicos para o serodiagnóstico da fasciolose humana por *F. hepatica* (Sampaio-Silva *et al.*, 1996; Cordova *et al.*, 1997; O'Neill *et al.*, 1998; Cordova *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 1999; Strauss *et al.*, 1999 e Rokni *et al.*, 2002), bem como *F. gigantica* (Maleewong *et al.*, 1996; Ikeda, 1998; Intapan *et al.*, 1998; Maleewong *et al.*, 1999; Intapan *et al.*, 2004 e Watpan *et al.*, 2005). Proteases de cisteína recombinantes de *F. hepatica* produzidas em leveduras (O'Neill *et al.*, 1999) ou em *Escherichia coli* (Carnevale *et al.*, 2001a) têm sido utilizadas nos métodos de ELISA para o diagnóstico da infecção humana, fornecendo resultados semelhantes aos antígenos nativos.

## 2.12. Prevenção e Controlo

A infecção humana esteve sempre relacionada à endemicidade animal, sendo assim, as medidas de prevenção e controlo recomendadas foram as mesmas aplicadas para fasciolose animal (Mas-Coma *et al.*, 2005). No entanto, estudos recentes em áreas endémicas humanas têm mostrado que padrões epidemiológicos bem conhecidos da fasciolose não podem explicar sempre as características de transmissão numa determinada área, de modo que para aplicar medidas de controlo, deve-se considerar os resultados de estudos eco-epidemiológicos realizados na zona em causa, uma vez que, a adaptação às novas condições ambientais pode alterar as características de transmissão. Consequentemente, as comunidades de áreas endémicas devem ser informadas adequadamente sobre a doença, a sua transmissão e os seus riscos (Mas-Coma *et al.*, 1999b).

A administração de anti-helmínticos é o principal método usado para controlar a fasciolose em animais. Os fármacos anti-helmínticos diferem em disponibilidade, preço, eficácia e segurança. Porém a maioria dos produtos são eficazes contra as espécies *F. hepatica* e *F. gigantica* (Torgerson & Claxton, 1999).

A prevenção da fasciolose humana pode ser feita pelo rigoroso controlo de agriões e outros vegetais aquáticos contendo metacercárias, para o consumo humano, especialmente em zonas

endêmicas. Entre os legumes incriminados, as espécies de plantas de água doce diferem de acordo com zonas geográficas e hábitos alimentares (Mas-Coma *et al.*, 1995, 1999c e Mas-Coma, 2004).

As características anfíbias dos hospedeiros intermediários, como *L. truncatula*, estão ligadas aos focos de transmissão em plantações de vegetais não-aquáticas que requerem irrigação frequente (El Sayed *et al.*, 1997 e Motawea *et al.*, 2001). Além disso, resultados recentes sugerem que os seres humanos que consomem pratos preparados a partir de fígados crus infectados com parasitas imaturos também podem ser infectados (Taira *et al.*, 1997 e Cho *et al.*, 1999).

A capacidade das metacercárias para prosseguirem o ciclo de vida depende da idade, sendo menor nas mais velhas (longevidade máxima de 48 semanas) e é independente do hospedeiro animal, tendo sido demonstrado que parasitas provenientes de hospedeiros secundários, como suínos e equinos, provocam os mesmos riscos que os dos hospedeiros principais, tais como ovinos e bovinos (Valero & Mas-Coma, 2000).

A capacidade de sobrevivência e resistência à dessecação das metacercárias explica a contaminação humana pelo consumo de plantas colhidas em ambientes secos, mas que foram submersas em água algumas semanas ou meses antes da colheita, como por exemplo, no Irão (Mas-Coma, 2004). A comercialização de vegetais contendo metacercárias em mercados não controlados de cidades, origina a infecção urbana (Mas-Coma, 2004). Bebidas locais também têm sido referidos como veículos de transmissão do parasita como, por exemplo, no Irão e Cabo Verde (WHO, 1995; Grácio & Azevedo, 1998 e Mas-Coma, 2004).

A água é frequentemente citada como uma fonte de infecção humana. No Altiplano Boliviano, 13% das metacercárias de todos os isolados são flutuantes (Bargues *et al.*, 1996). Água contendo metacercárias também pode contaminar os alimentos, utensílios de cozinha ou outros objectos e, assim, tornar-se fonte fortuita de infecção (Mas-Coma, 2004). A importância da transmissão de fasciolose através da água é apoiada por muitos resultados indirectos. Existe associação positiva significativa entre a infecção do fígado por *Fasciola* spp e outras infecções por protozoários e helmintas transmitidos por água, tais como *Giardia intestinalis* em países andinos

(Esteban *et al.*, 1997a, 2002) ou *Entamoeba coli*, *Chilomastix mesnili* e *Schistosoma mansoni* no Egipto (Esteban *et al.*, 2003). Em muitas áreas hiperendémicas humanas das Américas, as pessoas não têm o hábito de comer agriões (Hillyer & Apt, 1997) e, zonas como a área de irrigação Asillo no Altiplano Peruano, os habitantes não consomem plantas de água doce (Esteban *et al.*, 2002).

Na região do Delta do Nilo, pessoas que vivem em casas onde há água canalizada, mostraram ter um maior risco de infecção (Curtale *et al.*, 2003). Na localidade egípcia de Tiba, onde uma prevalência de 18,0% foi encontrada inicialmente, a infecção humana diminuiu acentuadamente após a construção e utilização das chamadas “unidades de lavagem”, em que a água é filtrada de forma adequada (Mas-Coma, 2004).

### 2.13. Tratamento

Muitos fármacos têm sido usados para tratar a fasciolose em doentes humanos. Dehydroemetine (deidroemetina) foi considerada a terapia de escolha há algumas décadas atrás, mas a sua toxicidade permitiu que o Bitionol se tornasse o fármaco de escolha por muitos anos, apesar do seu período de tratamento ser longo (Savioli *et al.*, 1999). O praziquantel, prescrito em três doses, por via oral, de 25 mg/kg de peso do doente, em intervalos de 4 horas, cura apenas 60 a 70% dos casos (Rey, 2008).

A falta de consenso sobre a terapêutica de escolha da fasciolose humana chegou ao fim quando foi provado que, em doses adequadas, triclabendazole, um derivado de benzimidazole [6-chloro-5-(2,3-dichlorophenoxy)-2-methylthiobenzimidazole], foi altamente eficiente nos seres humanos (Esteban *et al.*, 1998 e Mas-Coma *et al.*, 1999b). Triclabendazole para uso humano (Egaten®) é actualmente o fármaco de eleição para a fasciolose humana, causada tanto por *F. hepatica* como por *F. gigantica* (Savioli *et al.*, 1999). O triclabendazole é mais eficaz se administrado após as refeições (Lecaillon *et al.*, 1998) e a dose recomendada é de 10 mg/kg em dois regimes separados. Apt *et al.*, (1995) encontraram uma taxa de cura de 79,2% quando utilizado pela primeira vez e 100% após uma segunda terapia, e 79,4% e 93,9%, respectivamente, por El-



Morshedy *et al.*, (1999). Segundo Talaie *et al.*, (2004), apesar de estudos recentes mostrarem que triclabendazole parece manter a sua eficácia em áreas endêmicas humanas durante muitos anos, Millan *et al.*, (2000) mostraram que em 77 doentes submetidos ao tratamento, seis (8%) ainda eliminavam ovos nas fezes 60 dias após-tratamento com duas doses, embora todos esses casos tenham respondido a uma terceira dose de triclabendazole.

Apesar da possibilidade de re-infecção após o tratamento devido ao facto de se viver numa área endêmica não poder ser ignorada, o risco de aparecimento de resistência ao triclabendazole não pode ser ignorado, tendo em conta: (i) a utilização de triclabendazole na veterinária (Fasinex®) há muito tempo para o tratamento de animais em áreas endêmicas, (ii) a tradição de auto-tratamento dos humanos com Fasinex® devido à sua fácil disponibilidade e, (iii) o aparecimento recente de resistência ao triclabendazole no Velho Mundo (Europa, África e Ásia). Em animais, a resistência ao triclabendazole foi descrita pela primeira vez na Austrália (Overend & Bowen, 1995), depois na Irlanda (Lane, 1998 e O'Brien, 1998) e Escócia (Mitchell *et al.*, 1998) e mais recentemente, na Holanda (Moll *et al.*, 2000 e Gaasenbeek *et al.*, 2001). As estratégias para minimizar o desenvolvimento de resistência incluem a utilização de combinações de fármacos (Fairweather & Boray, 1999), embora essa abordagem implique o risco de criar resistência a múltiplos fármacos (Gaasenbeek *et al.*, 2001). Além disso, deve-se considerar que actualmente não há nenhum fármaco alternativo para o tratamento da fasciolose humana, os fármacos como Bitionol e outros já não estão comercialmente disponíveis (Millan *et al.*, 2000). Além do nitazoxanide, muito recentemente comercializado no México e considerada como eficaz no tratamento contra a fasciolose humana, em regime de tratamento durante 7 dias (Rossignol *et al.*, 1998), outro fármaco, o myrrh (Mirazid®), tem sido registado no Egipto (Massoud *et al.*, 2001), mas ainda requerem estudos sobre as suas eficácias e tolerâncias.

No entanto, novos agentes quimioterapêuticos estão sendo testados. Estes incluem compostos direccionados contra proteases de cisteína (Engel *et al.*, 1998 e Alcalá-Canto *et al.*, 2006, 2007), enzimas protectoras de radicais livres (Piedrafita *et al.*, 2000 e Keiser *et al.*, 2006b) ou

medicamentos eficazes por outros mecanismos (Keiser *et al.*, 2006a e Hegazi *et al.*, 2007). Porém, a investigação e o desenvolvimento destes compostos está numa fase preliminar (Bennet-Jenkins & Bryant, 1996).

## 2.14. Vacinas

Até à data, nenhuma vacina está disponível comercialmente para o tratamento das parasitoses por *F. hepatica* ou *F. gigantica*. No entanto, vários candidatos promissores à vacina foram identificados e vários trabalhos têm sido feitos na tentativa de encontrar vacinas que sejam eficazes (Spithill *et al.*, 1997; Spithill & Dalton, 1998; Smith, 1999; Spithill *et al.*, 1999a; Spithill *et al.*, 1999b; Dalton & Mulcahy, 2001; Hillyer, 2005 e McManus & Dalton, 2006).

Os promissores candidatos à vacina identificados incluem *Fatty-Acid-Binding Protein* (FABP), *cathepsin L-like proteases*, *Glutathione S-Transferase* (GST), leucina amino peptidase (LAP) e hemoglobina (Norbury, 2008).

Nos bovinos, a resposta protectora para *Fasciola* spp parece correlacionar-se com uma resposta imune Th1 ou mista Th1/Th2 (Dalton & Mulcahy, 2001). A vacinação pode induzir este tipo de resposta imune protectora (Mulcahy *et al.*, 1998; Mulcahy *et al.*, 1999a; Mulcahy *et al.*, 1999b; Mulcahy & Dalton, 2001 e Bentancor *et al.*, 2002), que é qualitativamente diferente da resposta não protectora tipicamente vista na infecção natural (Clery *et al.*, 1996; Bossaert *et al.*, 2000a; Bossaert *et al.*, 2000b e Zhang *et al.*, 2005). No entanto, a escolha do adjuvante parece importante no desenvolvimento de uma resposta imune protectora.

Embora ainda existam obstáculos, no futuro o surgimento de vacinas contra a parasitose por *Fasciola* spp parece promissor, uma vez que vacina para tremátodes não precisa ter 100% de protecção para ser comercialmente viável (McManus & Dalton, 2006).



# JUSTIFICAÇÃO

---



### 3. Justificação

A fasciolose é uma doença helmintíca crónica predominante em ruminantes, mas actualmente é considerada uma parasitose emergente/reemergente, devido ao aumento crescente de casos em humanos e animais a nível mundial (Mas-Coma *et al.*, 1999a).

Na fasciolose, a detecção de ovos do parasita nas fezes é considerada o método de diagnóstico mais confiável. No entanto, isto só é possível depois de 13-14 semanas após a infecção, quando os parasitas adultos começam a produzir e eliminar ovos. Por esta altura, os principais danos ao sistema hepático do hospedeiro já ocorreram (Guobadia & Fagbemi, 1997).

Devido ao polimorfismo do quadro clínico e à baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos, o diagnóstico é feito principalmente por métodos serológicos (Carnevale *et al.*, 2001b e Meshgi *et al.*, 2008). As vantagens das técnicas de imunodiagnóstico baseiam-se na detecção precoce da infecção durante a fase pré-patente e nas infecções moderadas. No entanto, o enorme potencial dos métodos serológicos na detecção precoce das infecções causadas por helmintas é prejudicado pela falta de especificidade e reacções cruzadas devido à presença de epítomos antigénicos comuns que coexistem em vários helmintas (Ghosh *et al.*, 2005).

O vasto repertório antigénico do parasita *Fasciola* sp. está sujeito a variações consideráveis durante o seu desenvolvimento no hospedeiro, desde o parasita imaturo no parênquima hepático ao parasita adulto nos ductos biliares. Portanto, a produção de antígenos ou anticorpos específicos é o primeiro passo no aumento da especificidade do serodiagnóstico das infecções causadas por helmintas (Ghosh *et al.*, 2005).

Para além disto, a melhoria dos testes imunológicos, nomeadamente, a utilização de antígeno homólogo, é de grande relevância para a especificidade e rapidez do diagnóstico.

Em Cabo Verde, a fasciolose animal e fasciolose humana são problemas clínicos e epidemiológicos de saúde pública. Ambas as fascioloses aguda e crónica foram encontradas no país

(Meira, 1966; Meira & Santa-Rita, 1966; Nozais *et al.*, 1998; Grácio & Azevedo, 1998; Grácio, 1999; Graham *et al.*, 2001 e Ka *et al.*, 2002).

A infecção humana é caracterizada pelo surgimento de patologias graves devido a danos que ocorrem nas células do fígado (hepátocitos), principalmente durante as primeiras fases da migração dos parasitas. A doença afecta o estado imune geral do hospedeiro definitivo, e não há nenhum método preciso para o diagnóstico precoce antes da eliminação dos ovos (El-Bahy, 1998 e Haseeb *et al.*, 2002).

Sem dúvida, a compreensão da epidemiologia das doenças parasitárias e dos factores que as influenciam, fornecem meios sobre os quais programas eficazes de prevenção e de controlo devem ser estabelecidos. Para tal, contribuem de modo significativo o diagnóstico específico da parasitose.

Neste sentido, a elaboração deste estudo teve como objectivo a avaliação de um método serológico sensível e específico, que possa ser facilmente aplicável em Cabo Verde e com baixo custo, pois onde a fasciolose é endémica, como forma de ajudar a detectar casos da doença no país, e assim, implementar medidas de controlo.

4

# OBJECTIVOS

---





## 4. Objectivos

### 4.1. Objectivo Geral

- ✓ Produzir e caracterizar antígenos de *Fasciola gigantica* e avaliá-los no imunodiagnóstico da fasciolose.

### 4.2. Objectivos Específicos

- ✓ Obter antígenos somático e deslipidizado de *Fasciola gigantica*;
- ✓ Avaliar os antígenos de *F. gigantica* no imunodiagnóstico da fasciolose pelo método de Micro-ELISA, em comparação com os de *F. hepatica*;
- ✓ Determinar o perfil electroforético e imunoreactividade das proteínas presentes nos antígenos somático e deslipidizado de *F. gigantica* e, comparar-lo com o de *F. hepatica*.



# MATERIAL E MÉTODOS

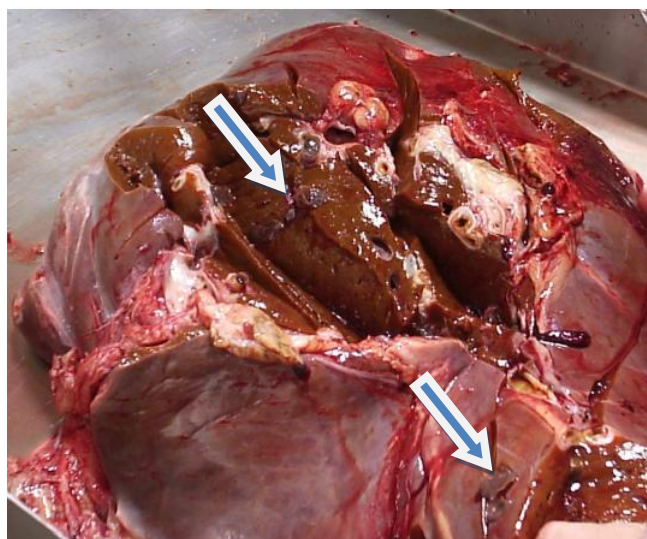
---



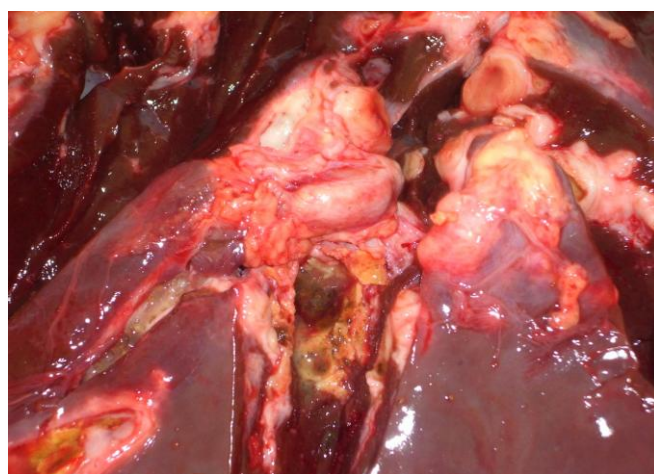
## 5. Material e Métodos

### 5.1. Obtenção dos parasitas adultos de *Fasciola gigantica*

Os parasitas *F. gigantica* conhecidos em Cabo Verde como “baratinhas e/ou baratas do fígado”, foram obtidos dos ductos biliares de fígados de bovinos (Figuras 8 e 9), abatidos nos matadouros das Cidades da Praia e Assomada, ilha de Santiago, Cabo Verde, durante o mês de Fevereiro de 2010. Os vermes adultos recolhidos foram lavados várias vezes com soro fisiológico para retirar as impurezas, conservados em soro fisiológico e congelados a -20°C, para posterior preparação do antígeno bruto e deslipidizado.



**Figura 8:** Fígado parasitado com *F. gigantica*, Matadouro da Cidade de Assomada, Cabo Verde, 2010 (original, António Almeida).

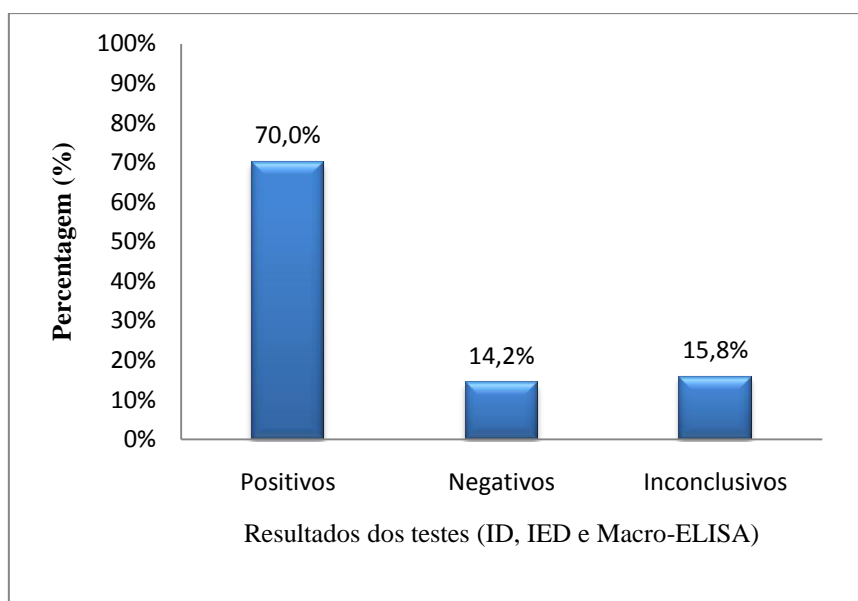


**Figura 9:** Fígado no início de litíase, Matadouro da Cidade de Assomada, Cabo Verde, 2010 (original, António Almeida).

## 5.2. Obtenção de soros humanos para a avaliação da reactividade dos antígenos

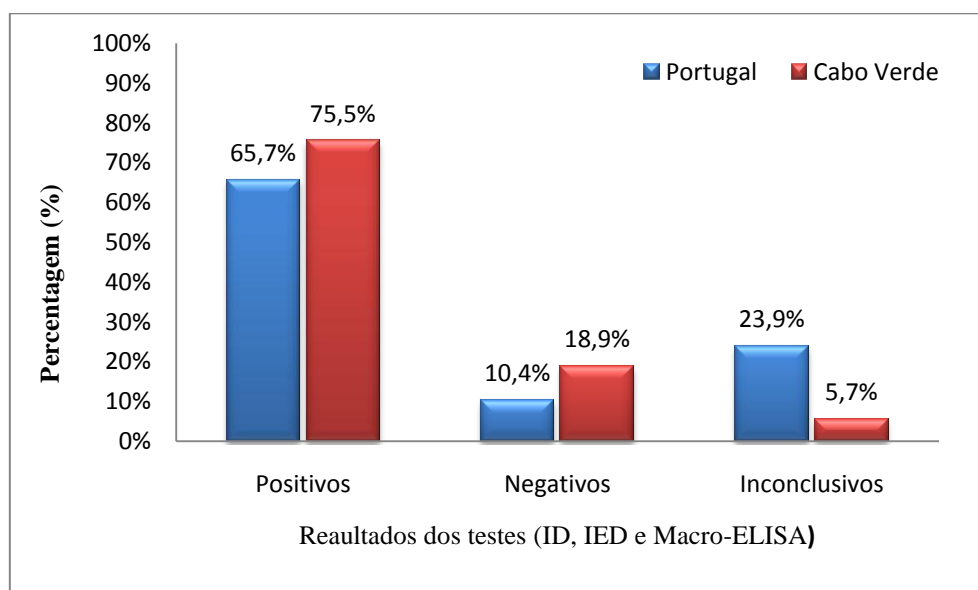
Os soros foram obtidos na Unidade de Helminologia e Malacologia Médicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (UHMM/IHMT). Obtiveram-se 178 soros, dos quais 111 eram procedentes de indivíduos de origem cabo-verdiana e os restantes 67 de indivíduos residentes em Portugal. Destes 178 soros, 120 tinham sido previamente analisados na UHMM/IHMT pelos métodos de imunodifusão (ID), imuno-electrodifusão (IED) e Macro-ELISA, utilizando-se antígenos de *F. hepatica*, e os 58 soros restantes, ainda não tinham sido analisados.

Dos soros que já tinham sido previamente analisados (n=120) na UHMM/IHMT pelos métodos de imunodifusão (ID), imuno-electrodifusão (IED) e Macro-ELISA, 84 (70%) foram positivos, 17 (14,2%) negativos e 19 (15,8%) inconclusivos para antígenos de *F. hepatica* (Figura 10).



**Figura 10:** Resultado geral de soros de indivíduos cabo-verdianos e residentes em Portugal, pelos métodos (ID, IED e Macro-ELISA).

Havia maior percentagem de positivos nos soros de indivíduos cabo-verdianos, e em contrapartida os soros de indivíduos residentes em Portugal tinham maior taxa de resultado inconclusivo (Figura 11).



**Figura 11:** Comparação dos resultados de soros de indivíduos cabo-verdianos e residentes em Portugal, pelos métodos (ID, IED e Macro-ELISA).

### 5.3. Obtenção de antígenos de parasitas adultos de *F. gigantica*

#### 5.3.1. Preparação de antígenos totais (AgTs)

Para a preparação do antígeno total de *F. gigantica*, seguiu-se o protocolo usado na UHMM/IHMT (Anexo 1). Com a finalidade de se obterem os parasitas adultos livres de matéria orgânica, estes foram lavados várias vezes com soro fisiológico estéril frio, e de seguida imersos numa solução salina 1‰ estéril. Posteriormente, os parasitas foram macerados com uma solução salina 1‰ estéril, até a obtenção de uma mistura homogênea, que foi congelada a -20°C.

Procedeu-se à congelação e descongelação por 3 vezes sucessivas com maceração, a fim de rebentar as células libertando as proteínas antigénicas; centrifugou-se a 4°C durante 45 minutos a 5000 r.p.m. numa centrífuga refrigerada, e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. O sobrenadante assim obtido constituiu o antígeno total que foi mantido a 4°C até à análise de sua concentração proteica e reactividade, e o resíduo foi reservado para a preparação de antígeno deslipidizado.



### **5.3.2. Concentração de antígeno total**

Foram usados tubos com filtros centrifugadores Millipore's® Amicon Ultra-15 10K que permitiram concentrar o antígeno total antes da determinação da concentração proteica.

### **5.3.3. Preparação de antígenos deslipidizados (AgDs)**

Para a preparação do antígeno deslipidizado de *F. gigantica*, seguiu-se também o protocolo usado na UHMM/IHMT (Anexo 2). O resíduo obtido a partir da preparação do antígeno total, foi submetido a duas lavagens com álcool etílico absoluto e uma com éter etílico anidro congelados.

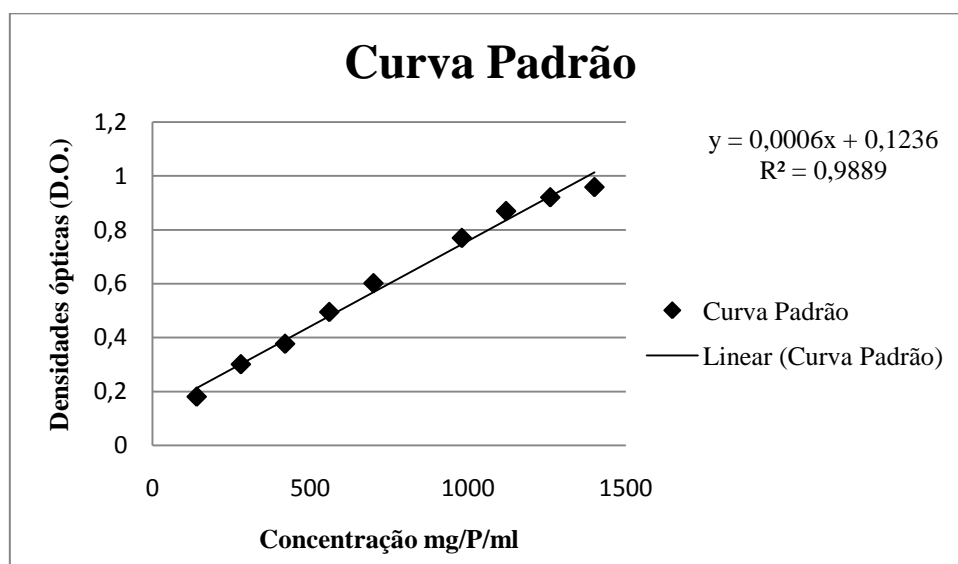
Colocou-se o resíduo numa placa de Petri adequada à quantidade obtida, que depois foi colocado num dissecador a 4°C até que a massa estivesse completamente seca (4 dias); pesou-se o resíduo obtido e colocou-se na proporção de 200mg/10ml de solução salina 1‰ estéril a 4°C no frigorífico; agitou-se manualmente 3 vezes ao dia durante 3 dias; centrifugou-se a 4°C durante 45 minutos a 5000 r.p.m. numa centrífuga refrigerada, e ao fim desse tempo retirou-se cuidadosamente o sobrenadante, que constituiu o antígeno solúvel deslipidizado. Este foi acondicionado a 4°C até à análise da sua concentração proteica e reactividade.

### **5.3.4. Concentração de antígeno deslipidizado**

Foram usados tubos com filtros centrifugadores Millipore's® Amicon Ultra-15 10K que permitiram concentrar o antígeno solúvel deslipidizado antes da determinação da concentração proteica.

### **5.3.5. Determinação da concentração da proteína das preparações antigénicas (Figura 12)**

A concentração de proteínas dos antígenos totais (AgTs) e deslipidizados (AgDs), foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando o kit “Bio-Rad Protein Assay” (Anexo 3).



**Figura 12:** Curva de calibração com as densidades ópticas obtidas.

#### **5.4. Avaliação dos antígenos pelo método imunológico – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

O ensaio imunoenzimático (ELISA), baseia-se no uso de antígenos ou anticorpos marcados com uma enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham actividade tanto imunológica quanto enzimática. Apresenta um dos componentes (antígeno ou anticorpo) fixado sobre um suporte adsorvente, o complexo antígeno-anticorpo-conjugado fica imobilizado, e a reacção pode ser facilmente revelada mediante a adição de um substrato específico que poderá actuar com a enzima produzindo uma cor visível a olho nu ou quantificável mediante o uso de técnicas colorimétricas e espectrofotométricas. No campo da Parasitologia estas técnicas adquiriram relevância nos últimos anos para o diagnóstico mediante a detecção de coproantígenos em amostras fecais e anticorpos séricos, tanto em medicina humana como veterinária (Queiroz, 2005).

Este método foi utilizado para determinar a especificidade e sensibilidade dos antígenos obtidos e a sua reactividade nos soros de indivíduos suspeitos da parasitose e com a parasitose confirmada. Utilizou-se ainda soros de indivíduos com outras parasitoses (Larva *migrans* visceral, *Ascaris lumbricoides*, hidatidose e cisticercose). A especificidade e sensibilidade, foram calculadas de acordo com Timmreck, (1994) e Smith, (1995).

Para a realização prática desta técnica, a metodologia descrita por Voller (1976) serviu-nos de base, com algumas alterações e, foram utilizadas microplacas de fundo plano para a sua execução (Anexo 4). Determinou-se as diluições dos antígenos e dos soros a aplicar nas placas e, a concentração óptima dos antígenos e dos soros através da titulação com soros controlo positivo e negativo. Os antígenos foram testados nas concentrações de 2 µg e 4 µg de proteína por mililitro (2 µg/P/ml, 4µg/P/ml) e os soros nas diluições de 1/200 e 1/400. Após optimização, as concentrações estabelecidas para os antígenos foram de 2 µg/P/ml e 4 µg/P/ml para os antígenos completo e deslipidizado, respectivamente e, a diluição dos soros 1/200 (para a imunoglobulina IgM) e 1/400 (para a imunoglobulina IgG). O conjugado anti-IgM humano marcado com peroxidase, foi usado na diluição de 1/50.000 e anti-IgG humano também conjugado com peroxidase, numa diluição de 1/40.000. Utilizou-se como controlos positivos soros de indivíduos infectados com o parasita e que apresentavam ovos nas fezes, sendo os controlos negativos constituídos por indivíduos não infectados.

Nas diferentes soluções utilizou-se um volume de 100 µl em cada poço da placa, com excepção do tampão de lavagem PBS/Tween em que se usaram 200 µl e da solução bloqueadora da reacção que se aplicou um volume de 50 µl por poço. Os soros foram testados em duplicado sendo o valor da absorbância resultante da média dos valores apresentados na leitura de cada soro.

As placas foram sensibilizadas com 100 µl de solução antigénica por poço (2 µl do antígeno total e 4µl do antígeno deslipidizado) diluído em tampão carbonato pH 9,6 (15mM NaCO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>) durante 30 minutos na estufa a 37°C e uma noite a 4°C. Após este tempo as placas foram lavadas por quatro vezes com tampão PBS/Tween (200 µl / poço) com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e, de seguida bloqueadas, com 2% de albumina de soro bovino, Sigma (BSA) diluída em PBS/Tween e incubados durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente, colocaram-se os soros na diluição de 1/200 (para IgM) e 1/400 (para IgG) em PBS/Tween, seguindo-se a sua incubação durante 2 horas à temperatura ambiente (TA), e posteriormente uma noite a 4°C.

Após as lavagens, reincubaram-se as placas com os diferentes conjugados. No caso da IgM (Sigma) usou-se uma diluição 1/50.000 em PBS/Tween e, para IgG uma diluição 1/40.000 em PBS/Tween, seguidas de incubação durante 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Após a remoção do conjugado procedeu-se a novas lavagens com PBS/Tween e colocou-se o substrato cromogénico (9 mg de ortofenildiamina-OPD, em 25 ml de Tampão substrato (0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 ácido cítrico, pH 5,5 e 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%), incubaram-se as placas na obscuridade durante 30 minutos e bloqueou-se a reacção com 50 µl de HCl 2N. A absorbância foi lida num espectrofotómetro (Anthos 2020) a um comprimento de onda de 492 nanómetros (nm).

Após serem determinadas as densidades ópticas, consideraram-se positivos os soros com valores de absorvância acima do *cut-off*. Este foi determinado através da soma da média da densidade óptica dos controlos negativos acrescida de três vezes o desvio padrão dos mesmos ( $\bar{X} + 3SD$ ).

### 5.5. Perfil electroforético das proteínas presentes nos antígenos por “Western-blot”

A electroforese consiste em fazer migrar qualquer ião ou grupo com carga eléctrica através da aplicação de um campo eléctrico, numa matriz que normalmente é um gel. A velocidade de migração da partícula depende da carga, do seu peso molecular e da intensidade do campo aplicado. Quanto maior a razão entre a carga eléctrica e a massa de uma partícula, mais depressa esta migrará (Queiroz, 2005).

Escolhe-se a malha do gel, dependendo do perfil da proteína. O grau de filtração molecular vai depender do tamanho dos poros. O tamanho efectivo dos poros varia com a concentração de acrilamida utilizada na polimerização (mais acrilamida, menor o tamanho dos poros) e também com a concentração de bis-acrilamida utilizada (Queiroz, 2005).

### **5.5.1. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

Com a finalidade de identificar as moléculas antigénicas que poderiam ser reconhecidas pelos soros de indivíduos com suspeita de fasciolose, procedeu-se à análise das fracções dos antígenos totais e deslipidizados de *F. gigantica* e *F. hepatica*. Para isso utilizou-se um gel de poliacrilamida numa concentração de 4% para o gel de concentração e 15% para o gel de separação, em condições reduzidas (Anexo 5).

Foram utilizados padrões de peso molecular de referência (GE Healthcare, “Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers”) compostos por dez bandas de seis cores diferentes, azul de 17, 38 e 225 kDa; vermelho de 12 e 150 kDa; verde de 24 e 102 kDa; amarelo de 76 kDa; púrpura de 52 kDa e laranja de 31 kDa.

A separação das proteínas antigénicas teve como base o método descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações. Utilizou-se um padrão de pesos moleculares conhecidos para fazer a comparação, procedendo-se a uma primeira electroforese aplicando os antígenos em estudo no mesmo gel, juntamente com o padrão.

A amperagem aplicada durante a corrida foi de 400 mA e uma voltagem de 120 V, durante cerca de 1h e 32 min. O tempo de corrida foi determinado pela migração do azul de bromofenol.

Após a corrida, o gel foi corado com solução de Azul de Coomassie por 30 minutos. A seguir lavou-se com uma solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada), até as bandas das proteínas ficarem bem nítidas.

Por fim, o gel foi conservado numa embalagem de plástico contendo água destilada e conservado à temperatura de 4° C. Foi utilizado um pente de 10 dentes, com 1 mm de espessura. As amostras foram diluídas em tampão da amostra (1,2 ml tris-HCl, 0,5 M pH 6,8; 4,8 ml de H<sub>2</sub>O: 1 ml de glicerol; 2 ml de SDS 10% e 0,5 ml de azul de bromofenol 0,025%) conforme mostra o Quadro 1.

**Quadro 1:** Diluição das amostras em estudo (As soluções e os procedimentos utilizados para a electroforese estão descritos no Anexo 5).

| Amostra   | Diluição |
|---|----------|
| 20 µl Antígeno total de <i>Fasciola gigantica</i>   | 1:1      |
| 20 µl Antígeno deslipidizado de <i>F. gigantica</i> | 1:1      |
| 20 µl Antígeno total de <i>F. hepatica</i>          | 1:1      |
| 20 µl Antígeno deslipidizado de <i>F. hepatica</i>  | 1:1      |
| 10 µl Padrão molecular                              | Puro     |

### 5.5.2. “Immunoblotting”

Conhecido o perfil electroforético dos antígenos, efectuou-se o mesmo procedimento de separação electroforética mas, usando para o efeito, géis de poço único, com o objectivo de transferir as fracções antigénicas para um suporte físico (membranas de nitrocelulose também designadas por “blots”). Para a separação das proteínas antigénicas, utilizaram-se padrões de pesos moleculares diferentes da BIO-RAD (Precision Plus Protein™ Standards - Kaleidoscope™) compostos por dez bandas de cinco cores, amarelo de 10 kDa, verde de 37 kDa, púrpura de 150 kDa, cor-de-rosa de 25 kDa e 75 kDa, e azul de 15, 20, 50, 100 e 250 kDa. Posteriormente, recorreu-se a um outro padrão de pesos moleculares, “SDS-PAGE Molecular Weight Standarts, Broad Range”, também da BIO-RAD, compostos por Miosina de 200 kDa, β-Galactosidase de 116,25 kDa, Fosforilase b de 97,4 kDa, Soro Albumina Bovina de 66,2 kDa, Albumina de Ovo de 45 kDa, Anidrase Carbónica de 31 kDa, Inibidor de Tripsina de 21,5 kDa, Lisozima de 14,4 kDa e Aprotinina de 6,5 kDa.

As amostras dos antígenos foram diluídas em 160 µl de tampão de amostra (1:1) e fervidas a 95° por 5 minutos, sendo depois aplicadas num mini-gel Laemmli (1970).

A transferência dos géis, nas condições anteriormente descritas, foi efectuada conforme o protocolo de referência e de acordo com as características do respectivo equipamento (*Transblot* da BIO-RAD). Usaram-se membranas Immobilon™ PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) com poro de 0,45 µm (Anexo 6).

A transferência realizou-se a uma temperatura de 23°C e uma voltagem de 100 V, durante 1h e 40 minutos. A membrana foi depois colocada em leite magro por uma noite a 4°C, para bloquear as reacções inespecíficas dos antígenos.

As membranas transferidas foram secas entre folhas de papel de filtro e depois guardadas a -20°C, entre duas folhas de papel de filtro, envolvidas em papel de alumínio, identificadas quanto ao antígeno transferido, e datas de realização da electroforese e da respectiva transferência.

Os soros foram diluídos a 1:100 (para IgG) e 1:50 (para IgM) em PBS/leite a 5% e incubados 3 horas à temperatura ambiente e uma noite a 4°C.

O conjugado anti-IgG peroxidase foi diluído a 1:1000 e o conjugado anti-IgM a 1:500 em PBS/leite e, permaneceram duas horas à temperatura ambiente, sob agitação. Procedeu-se a 3 lavagens com PBS/Tween e uma com PBS sem Tween. Adicionou-se o substrato (15 mg de 4-cloro-1-naftol; 5 ml de metanol; 20 ml de PBS sem Tween e 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), estando com atenção ao aparecimento das bandas. Quando as tiras começaram a escurecer, parou-se a reacção com água destilada. Por último, as tiras foram secas entre duas folhas de papel de filtro e colocadas sobre uma folha A4 com o respectivo padrão.

O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com o peso molecular dos padrões.

## **5.6. Análise estatística**

Na análise estatística dos resultados utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 18.0 para Microsoft Windows, para um nível de significância de 1%.

Visto que, as amostras em estudos não apresentaram uma distribuição normal, recorreu-se a testes não paramétricos. Utilizou-se o Teste de Mann-Whitney para averiguar se existiam diferenças significativas de resposta imuno-humoral entre os diferentes antígenos de *F. gigantica* e *F. hepatica* estudados.

O Factor *Kappa* foi utilizado para averiguar o nível de concordância entre os métodos com os antígenos de *F. gigantica* e *F. hepatica* estudados.

Recorreu-se ao programa informático Microsoft Office Excel 2007 para a elaboração dos gráficos.





# RESULTADOS

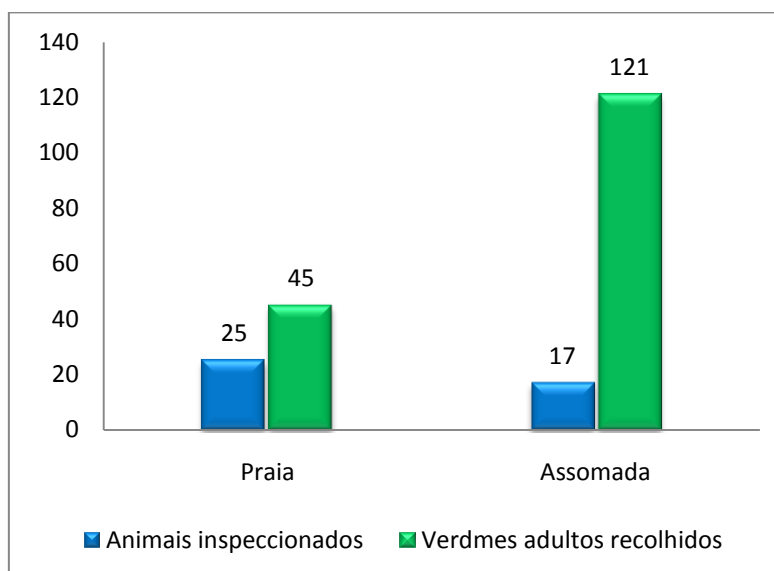
---



## 6. Resultados

### 6.1. Obtenção dos parasitas adultos de *F. gigantica*

Os parasitas foram recolhidos de animais bovinos fêmeas ( $n=42$ ), com idades compreendidas entre os 18 meses e sete anos, em dois matadouros diferentes nos concelhos de Assomada e Praia, ilha de Santiago, Cabo Verde. Apesar de ter sido inspeccionado maior número de animais no matadouro do concelho da Praia, observou-se uma carga parasitária (número de vermes adultos) superior nos animais que foram abatidos no matadouro do concelho de Assomada (Figura 13).



**Figura 13:** Número de animais inspeccionados e vermes adultos recolhidos nos matadouros na ilha de Santiago, Cabo Verde.

### 6.2. Obtenção dos soros humanos para o estudo

Dos 178 soros obtidos, 111 (62,4%) eram de indivíduos de origem Cabo-Verdiana, maioritariamente do sexo masculino e com idades compreendidas entre os sete meses e 89 anos ( $\bar{x}=43,4\pm22,1$ ), sendo os restantes 67 (37,6%) de indivíduos residentes em Portugal. A maioria era também do sexo masculino, com idades entre os cinco e 78 anos ( $\bar{x}=36,4\pm18,7$ ) (Quadro 2).

**Quadro 2:** Perfil dos indivíduos com soros utilizados no estudo.

| Origem     | N              | Idade                 |         |         | Sexo            |                  |                    |
|------------|----------------|-----------------------|---------|---------|-----------------|------------------|--------------------|
|            | (%)            | Média<br>( $\pm$ SD)  | Mínima  | Máxima  | Feminino<br>(%) | Masculino<br>(%) | Sem registo<br>(%) |
| Cabo Verde | 111<br>(62,4%) | 43,4<br>( $\pm$ 22,1) | 7 Meses | 89 Anos | 17<br>(15,3%)   | 32<br>(28,8%)    | 62<br>(55,9%)      |
| Portugal   | 67<br>(37,6%)  | 36,4<br>( $\pm$ 18,7) | 5 Anos  | 78 Anos | 31<br>(46,3%)   | 36<br>(53,7%)    | 0                  |

### 6.3. Obtenção e determinação da concentração proteica das preparações antigénicas

Prepararam-se dois antígenos de *F. gigantica*, o total e o deslipidizado, de acordo com a metodologia usada na UHMM/IHMT e, após a determinação da concentração proteica destas preparações antigénicas por comparação com a curva padrão pelo método de Bradford (1976), procedeu-se à sua avaliação com os antígenos correspondentes de *F. hepatica* (total e deslipidizado), produzidos na UHMM/IHMT. Os antígenos totais de *F. gigantica* e *F. hepatica* apresentaram valores proteicos mais elevados do que os respectivos antígenos deslipidizados e, além disso, verificou-se que as preparações de *F. hepatica* tinham um teor proteico superior às correspondentes de *F. gigantica* (Quadro 3).

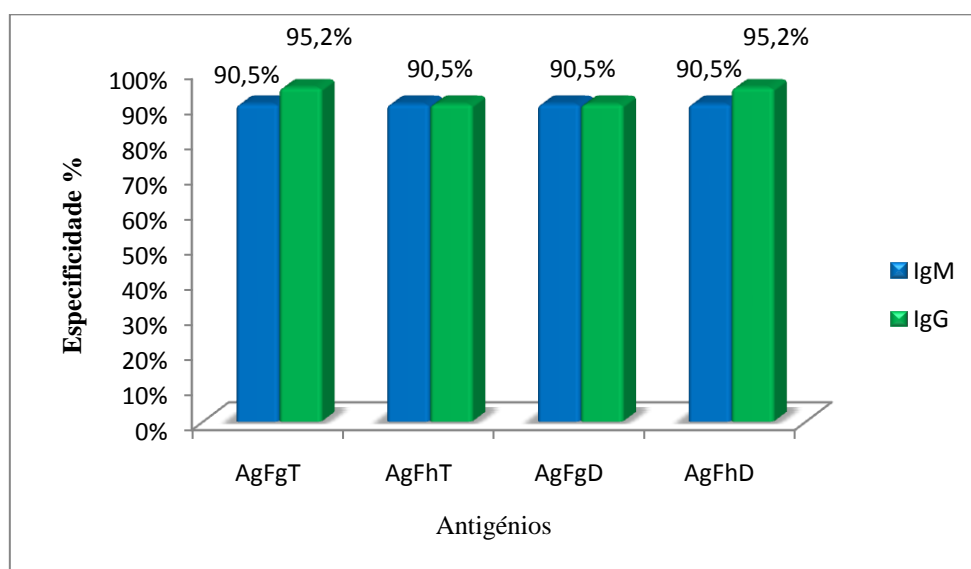
**Quadro 3:** Origem, data de produção e concentração proteica dos antígenos em estudo.

| Antígenos | Origem     | Data de Produção | Concentração proteica |
|-----------|------------|------------------|-----------------------|
| AgFgT     | Cabo Verde | 2010             | 1904 $\mu$ g/P/ml     |
| AgFgD     | Cabo Verde | 2010             | 308 $\mu$ g/P/ml      |
| AgFhT     | Portugal   | 1994             | 2030 $\mu$ g/P/ml     |
| AgFhD     | Portugal   | 1992             | 630 $\mu$ g/P/ml      |

AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*;  
 AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*

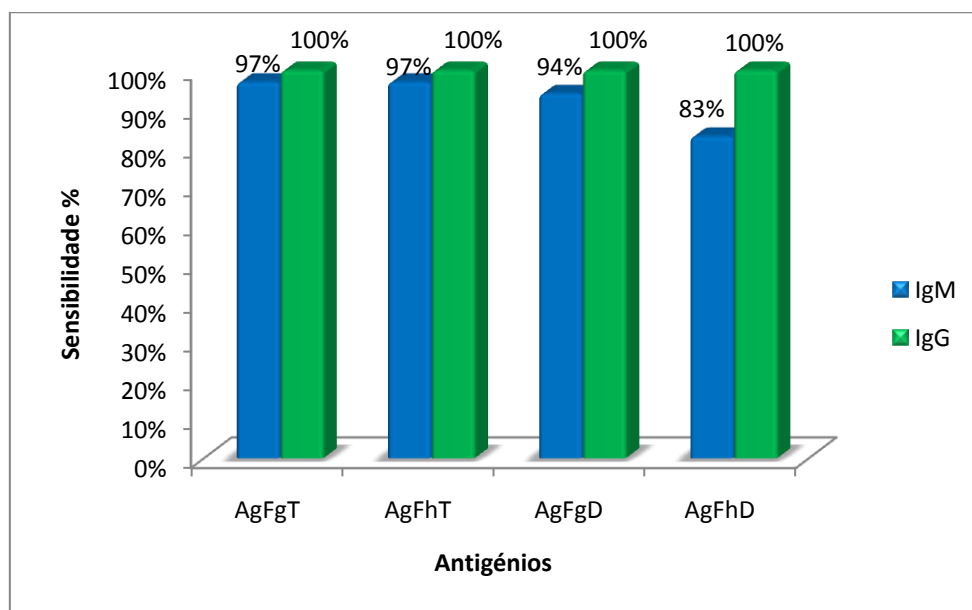
#### 6.4. Avaliação da especificidade e sensibilidade das preparações antigénicas

Das quatro preparações antigénicas avaliadas neste estudo, o antígeno total de *F. gigantica* e o deslipidizado de *F. hepatica* foram os que apresentaram maior especificidade (95,2 %), para IgG, verificando-se reacção cruzada apenas com soro de um indivíduo parasitado por *Ascaris lumbricoides*. Em relação ao anticorpo IgM, houve reacção cruzada de todos os antígenos com soros de doentes com Larva *migrans* visceral e *A. lumbricoides* (especificidade de 90,5%). Em duas preparações antigénicas AgFhT e AgFgD, ocorreu reacção cruzada para ambos os anticorpos IgM e IgG, com os soros acima referidos (Figura 14).



**Figura 14:** Especificidade das quatro preparações antigénicas em estudo. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*, AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

Quanto à sensibilidade, todos os antígenos avaliados apresentaram sensibilidade elevada (100%) quando testados para IgG, enquanto para IgM, obtiveram-se valores compreendidos entre 83% e 97% (Figura 15).

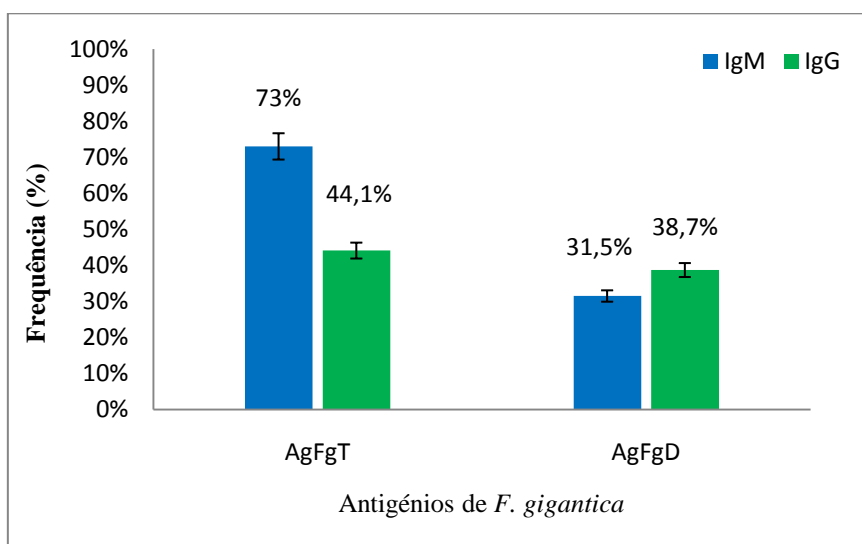


**Figura 15:** Sensibilidade das quatro preparações antigénicas em estudo. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*, AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

## 6.5. Comparação das quatro preparações antigénicas no diagnóstico de fasciolose pelo método imunológico – Micro-ELISA

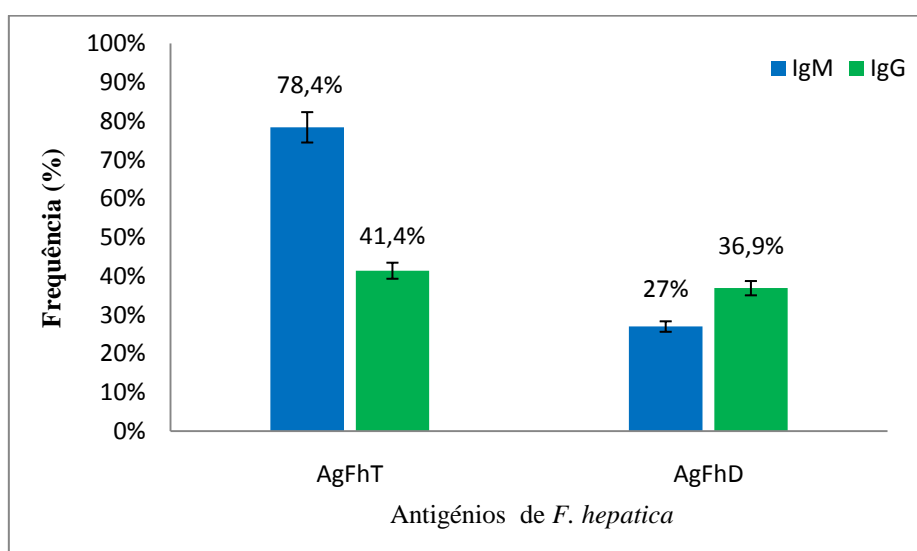
### 6.5.1. Soros de indivíduos cabo-verdianos

Relativamente aos antígenos de *F. gigantica*, dos 111 soros de indivíduos cabo-verdianos analisados, 81 (73%) tinham níveis de anticorpos IgM anti-*Fasciola* superiores ao limiar de positividade com o antígeno total (AgFgT) e apenas 35 (31,5%) tinham valores positivos com antígeno deslipidizado (AgFgD). Quanto à IgG, também se verificou uma positividade superior com o antígeno total 49 (44,1%) em relação ao antígeno deslipidizado 43 (38,7%) (Figura 16).



**Figura 16:** Soros de indivíduos cabo-verdianos positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. gigantica*. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*.

Constatou-se o mesmo comportamento para os antígenos de *F. hepatica*, 87 (78,4%) dos indivíduos estudados tinham níveis de anticorpos IgM anti-*Fasciola* superiores ao limiar de positividade para o antígeno total e apenas 30 (27,0%) para o antígeno deslipidizado. No que diz respeito aos níveis de IgG anti-*Fasciola*, 46 (41,4%) dos indivíduos tinham valores positivos para o antígeno total e 41 (36,9%) para o antígeno deslipidizado (Figura 17).



**Figura 17:** Soros de indivíduos cabo-verdianos positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. hepatica*. AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.



Os antígenos totais de ambos os parasitas tiveram maior reactividade na detecção do anticorpo IgM anti-*Fasciola* e, em contrapartida, os antígenos deslipidizados foram mais reactivos para o anticorpo IgG anti-*Fasciola* (Figuras 16 e 17).

As preparações antigénicas totais de *F. gigantica* e *F. hepatica*, demonstraram-se altos níveis de concordância quando testados para IgM ( $Kappa=0,708$ ;  $p-value<0,001$ ) e para IgG ( $Kappa=0,908$ ;  $p-value<0,001$ ). Para os antígenos deslipidizados dos dois parasitas, a concordância foi excelente para os dois anticorpos ( $Kappa=0,848$ ;  $p-value<0,001$  para IgM e  $Kappa=0,923$ ;  $p-value<0,001$  para IgG) (Quadro 4).

**Quadro 4:** Níveis de concordância (Factor *Kappa*) entre as quatro preparações antigénicas, em soros de indivíduos cabo-verdianos.

|              | Anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> |                 | Anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> |                 |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|
|              | [AgFgT - AgFhT]                     | [AgFgD - AgFhD] | [AgFgT - AgFhT]                     | [AgFgD - AgFhD] |
| Factor       | 0,708                               | 0,848           | 0,908                               | 0,923           |
| <i>Kappa</i> | $p<0,001$                           | $p<0,001$       | $p<0,001$                           | $p<0,001$       |

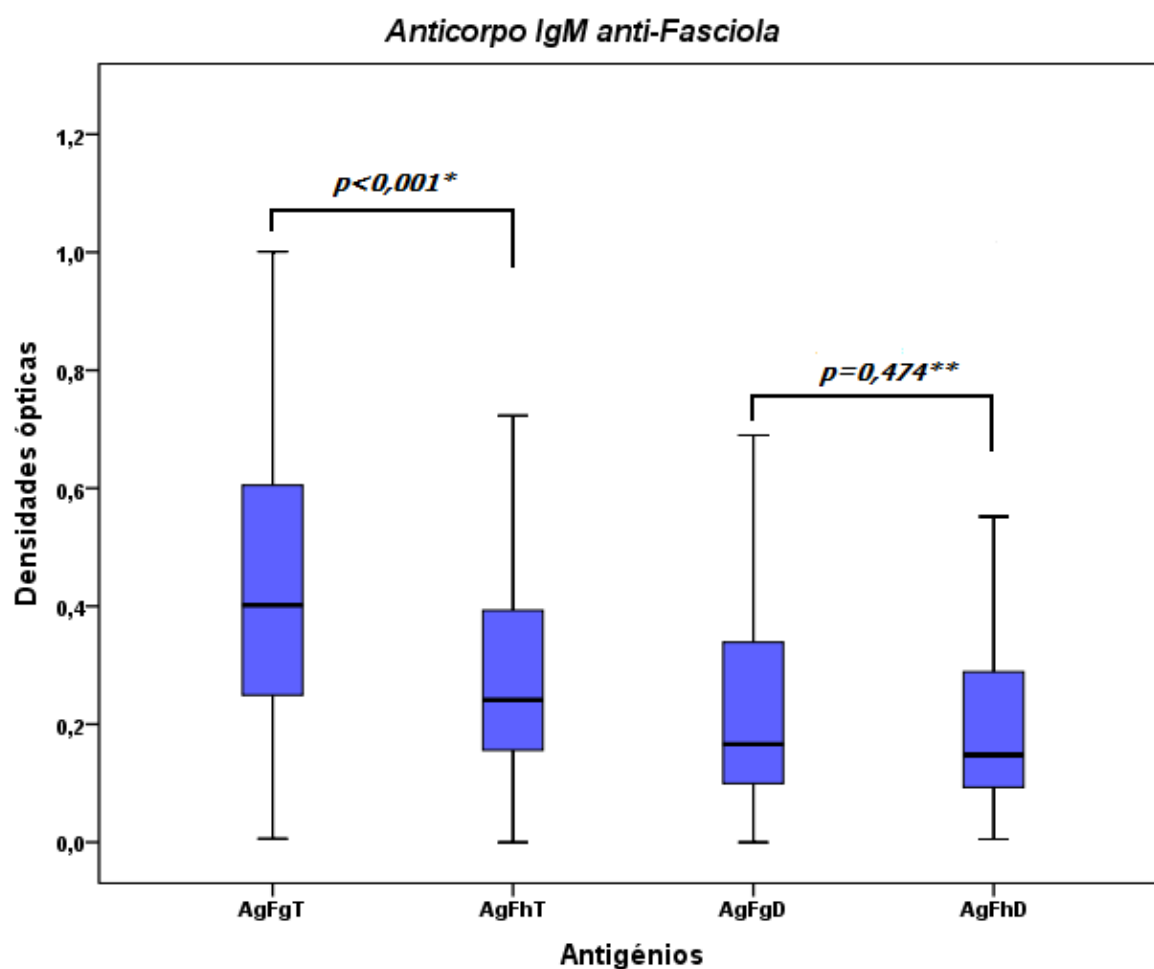
AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*, AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

O antígeno total de *F. gigantica* apresentou *scores* de densidades ópticas mais elevados do que o de *F. hepatica*, quando testados para os anticorpos IgM e IgG anti-*Fasciola* e, as diferenças observadas foram estatisticamente significativas ( $p<0,001$ ). Relativamente aos antígenos deslipidizados, as densidades ópticas pareceram ser maiores para o antígeno de *F. gigantica*, mas sem diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,474 >0,01$  para IgM;  $p=0,285 >0,01$  para IgG). O Quadro 5 e a Figura 18 ilustram a distribuição dos níveis das densidades ópticas dos quatro antígenos, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola* e, o Quadro 6 e a Figura 19 ilustram a distribuição das densidades ópticas das quatro preparações antigénicas quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*.

**Quadro 5:** Níveis séricos de IgM (Micro-ELISA), em soros de indivíduos cabo-verdianos.

| Antígenos | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão | Mediana | IC 99%        |
|-----------|--------|--------|-------|---------------|---------|---------------|
| AgFgT     | 0,006  | 1,001  | 0,445 | 0,237         | 0,402   | 0,386 – 0,504 |
| AgFhT     | 0,000  | 0,870  | 0,283 | 0,169         | 0,241   | 0,241 – 0,325 |
| AgFgD     | 0,000  | 1,215  | 0,255 | 0,242         | 0,166   | 0,195 – 0,315 |
| AgFhD     | 0,005  | 1,029  | 0,226 | 0,204         | 0,148   | 0,176 – 0,277 |

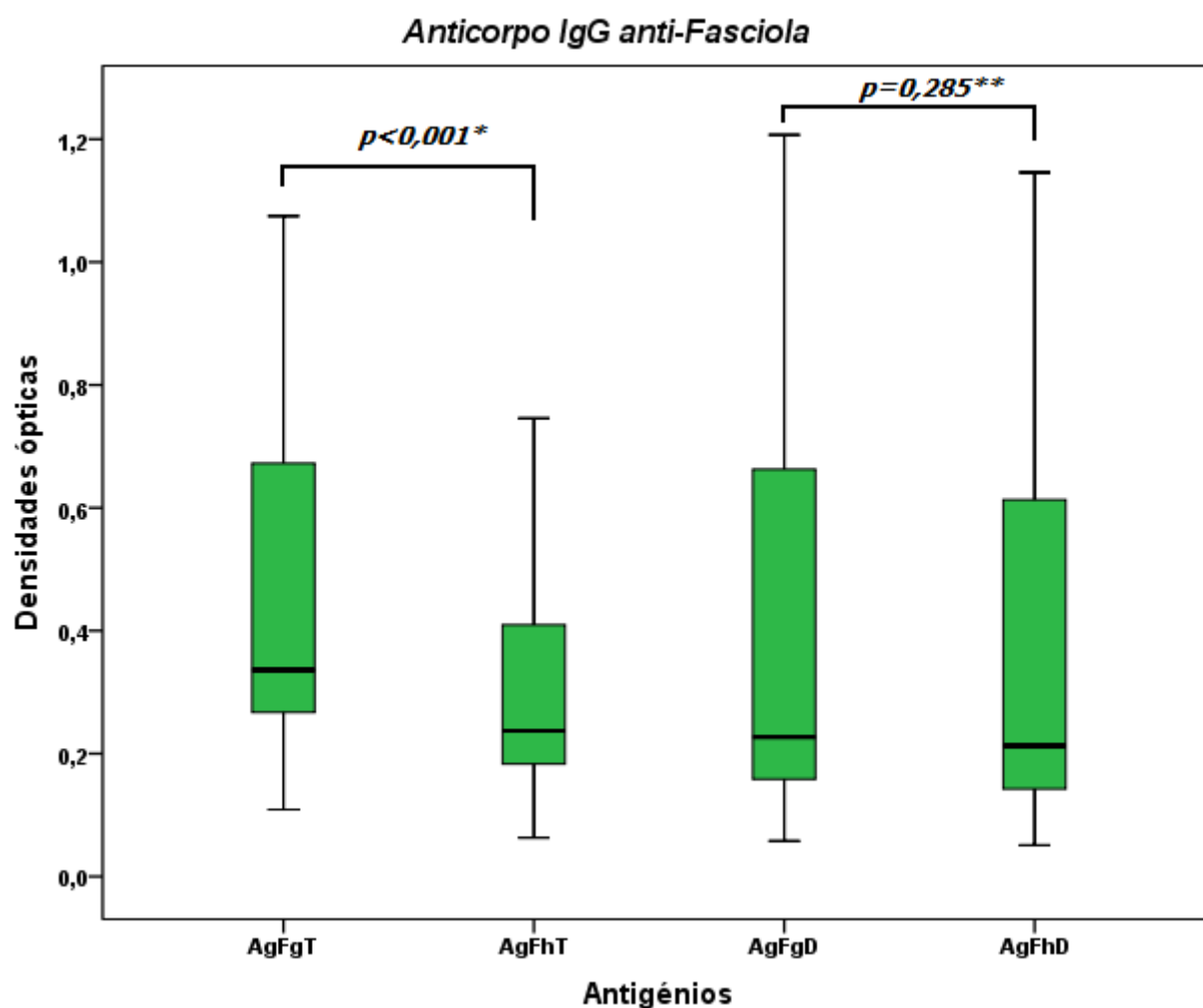
AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*,  
 AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.



**Figura 18:** Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos cabo-verdianos. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas.

**Quadro 6:** Níveis séricos de IgG (Micro-ELISA), em soros de indivíduos cabo-verdianos.

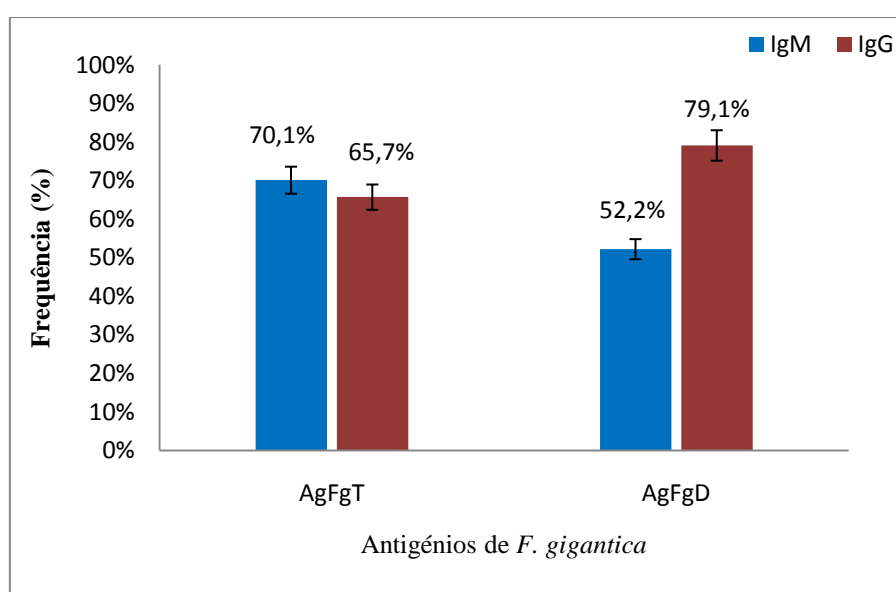
| Antígenos | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão | Mediana | IC 99%        |
|-----------|--------|--------|-------|---------------|---------|---------------|
| AgFgT     | 0,109  | 1,075  | 0,457 | 0,273         | 0,336   | 0,389 – 0,525 |
| AgFhT     | 0,063  | 0,869  | 0,316 | 0,205         | 0,237   | 0,265 – 0,367 |
| AgFgD     | 0,058  | 1,207  | 0,407 | 0,341         | 0,227   | 0,322 – 0,491 |
| AgFhD     | 0,051  | 1,146  | 0,378 | 0,324         | 0,213   | 0,297 – 0,458 |



**Figura 19:** Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos cabo-verdianos. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.  
\*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas.

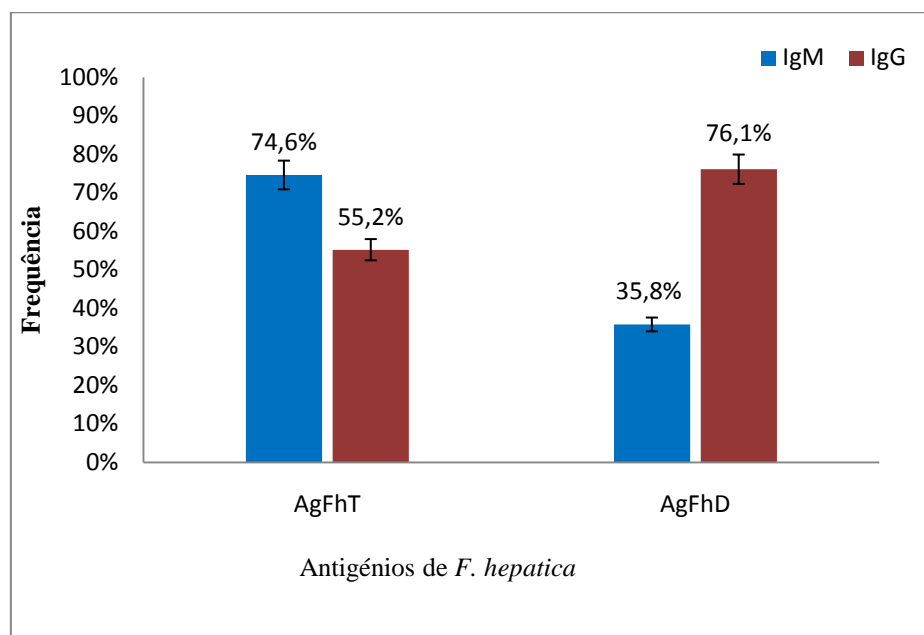
### 6.5.2. Soros de indivíduos residentes em Portugal

A análise dos antígenos de *F. gigantica* demonstrou, que dos 67 soros dos indivíduos residentes em Portugal, 47 (70,1%) tinham níveis de anticorpos IgM anti-*Fasciola* positivos com o antígeno total e, 35 (52,2%) com o antígeno deslipidizado. Para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, o antígeno deslipidizado apresentou valores positivos superiores 53 (79,1%) ao antígeno total 44 (65,7%) (Figura 20).



**Figura 20:** Soros de indivíduos residentes em Portugal positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. gigantica*. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*.

Quanto aos antígenos de *F. hepatica*, ao analisar os níveis do anticorpo IgM anti-*Fasciola*, encontrou-se maior percentagem de indivíduos positivos com o antígeno total 50 (74,6%) do que com o antígeno deslipidizado 24 (35,8%). No entanto, para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, a situação inverteu-se, com maiores valores de positividade com o antígeno deslipidizado 51 (76,1%) e, apenas 37 (55,2%) com o antígeno total (Figura 21).



**Figura 21:** Soros de indivíduos residentes em Portugal positivos para IgM e IgG (Micro-ELISA), utilizando antígenos de *F. hepatica*. AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

Os antígenos totais dos dois parasitas (*F. gigantica* e *F. hepatica*) tiveram maior reactividade na detecção do anticorpo IgM anti-*Fasciola*, e os antígenos deslipidizados foram mais reactivos para o anticorpo IgG anti-*Fasciola* (Figuras 20 e 21).

O nível de concordância entre os antígenos não foi tão alto como nos soros de indivíduos cabo-verdianos. Para o anticorpo IgM anti-*Fasciola*, o nível de concordância entre os antígenos totais dos dois parasitas foi ( $Kappa=0,739$ ;  $p<0,001$ ) e entre os antígenos deslipidizados ( $Kappa=0,676$ ;  $p<0,001$ ). Para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, o perfil foi semelhante,  $Kappa=0,661$ ;  $p<0,001$  entre os antígenos totais e  $Kappa=0,743$ ;  $p<0,001$  entre os antígenos deslipidizados (Quadro 7).

**Quadro 7:** Níveis de concordância (Factor *Kappa*) entre as quatro preparações antigénicas, em soros de indivíduos residentes em Portugal.

|        | Anticorpo IgM anti- <i>Fasciola</i> |                 | Anticorpo IgG anti- <i>Fasciola</i> |                 |
|--------|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|
|        | [AgFgT - AgFhT]                     | [AgFgD - AgFhD] | [AgFgT - AgFhT]                     | [AgFgD - AgFhD] |
| Factor | 0,739                               | 0,676           | 0,661                               | 0,743           |
| Kappa  | $p<0,001$                           | $p<0,001$       | $p<0,001$                           | $p<0,001$       |

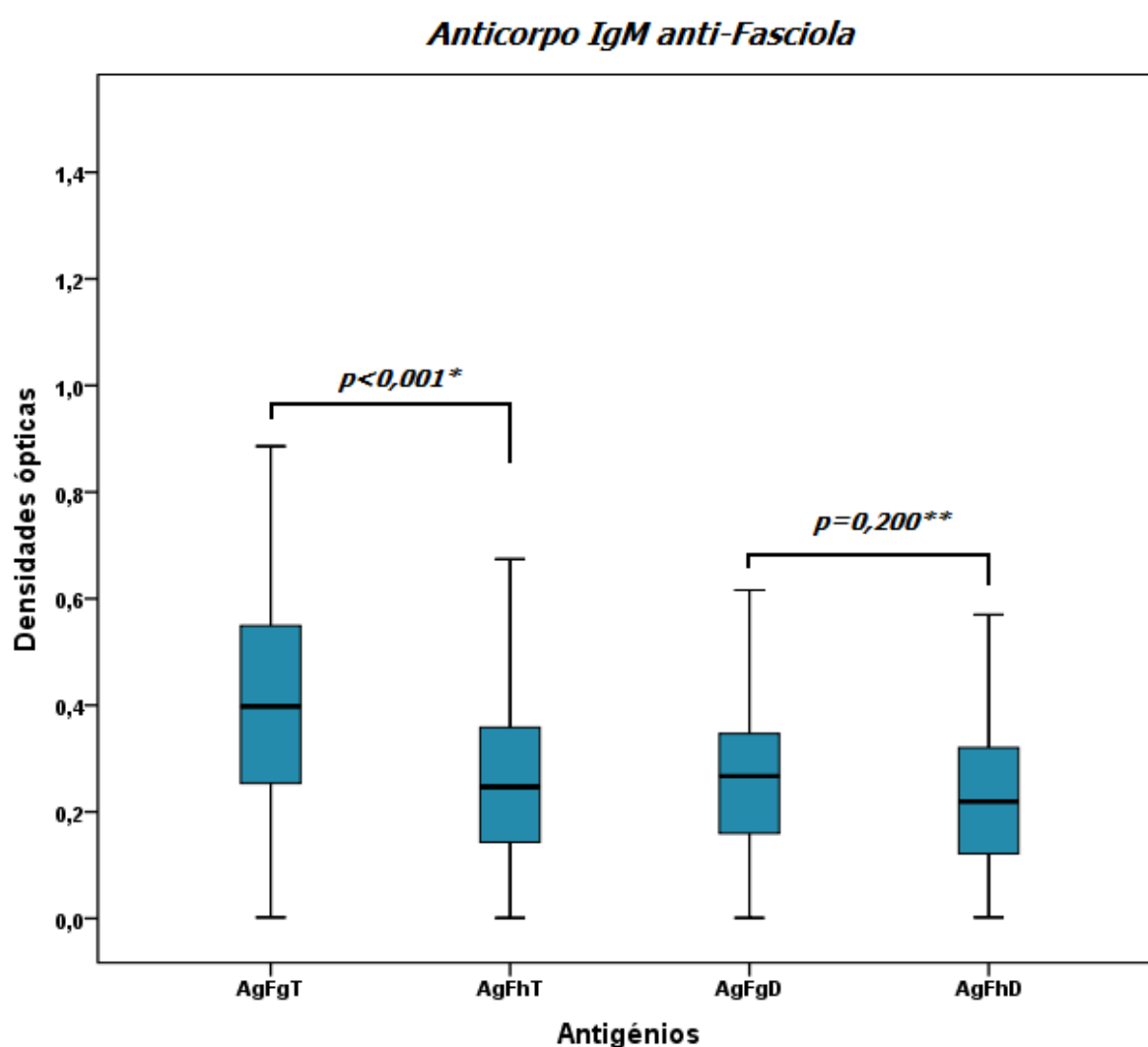
AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*,  
 AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

Ao comparar a reactividade dos antígenos totais de *F. gigantica* e *F. hepatica*, constatou-se diferenças estatisticamente significativa entre as densidades ópticas para o anticorpo IgM anti-*Fasciola* ( $p < 0,001$ ) e para o anticorpo IgG anti-*Fasciola* ( $p < 0,001$ ). No entanto, para os antígenos deslipidizados, as diferenças não foram estatisticamente significativas ( $p=0,200$  para o anticorpo IgM;  $p=0,478$  para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*). O Quadro 8 e a Figura 22 ilustram a distribuição dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola* e, o Quadro 9 e a Figura 23 ilustram a distribuição das densidades ópticas das quatro preparações antigénicas quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*.

**Quadro 8:** Níveis séricos de IgM (Micro-ELISA), em soros de indivíduos residentes em Portugal.

| Antígenos | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão | Mediana | IC 99%        |
|-----------|--------|--------|-------|---------------|---------|---------------|
| AgFgT     | 0,002  | 0,886  | 0,398 | 0,233         | 0,398   | 0,322 – 0,473 |
| AgFhT     | 0,001  | 0,674  | 0,255 | 0,167         | 0,247   | 0,200 – 0,309 |
| AgFgD     | 0,001  | 1,007  | 0,283 | 0,204         | 0,267   | 0,217 – 0,349 |
| AgFhD     | 0,002  | 0,874  | 0,241 | 0,172         | 0,219   | 0,185 – 0,296 |

AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*,  
AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

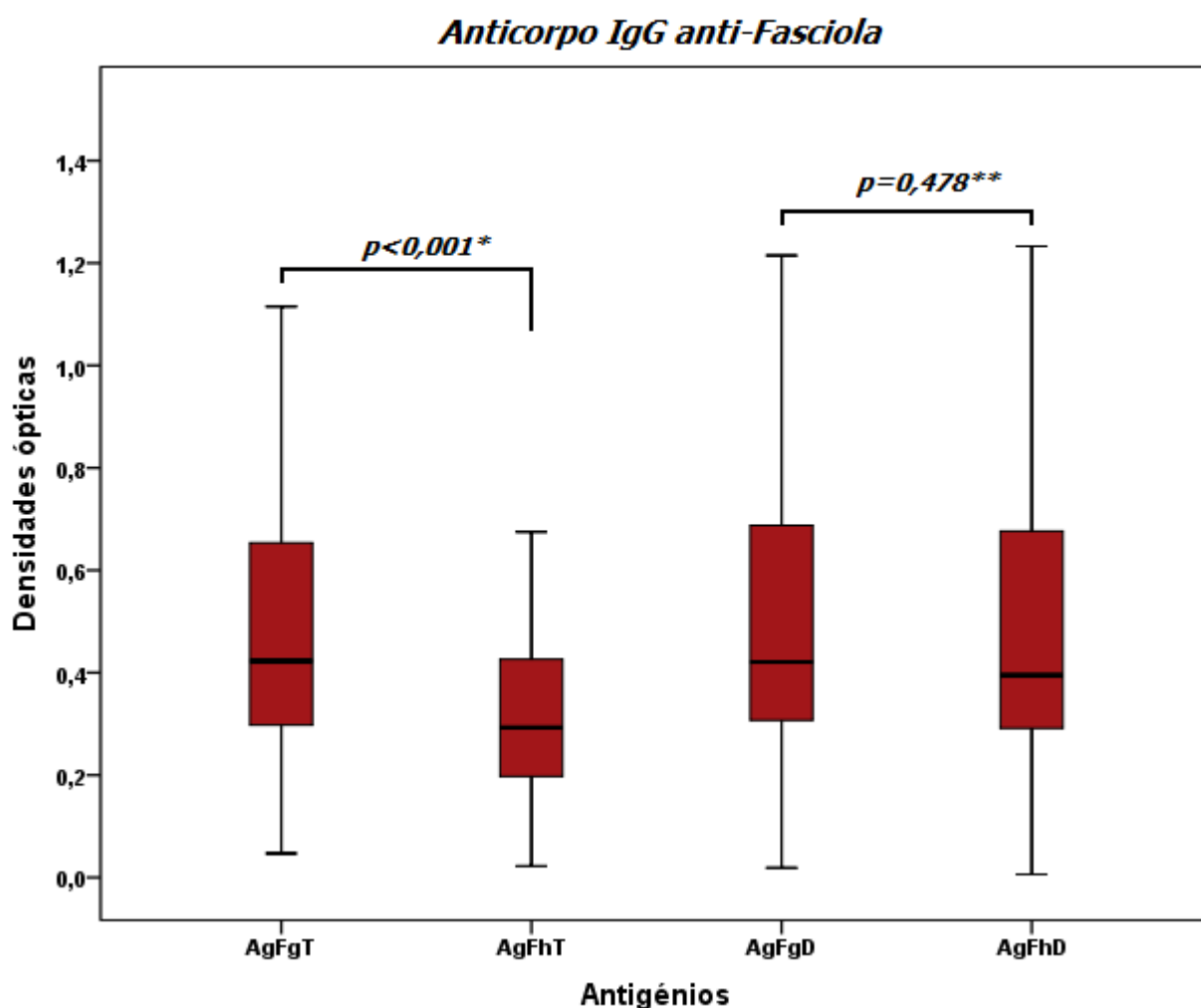


**Figura 22:** Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgM anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos residentes em Portugal. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas.

**Quadro 9:** Níveis séricos de IgG (Micro-ELISA), em soros de indivíduos residentes me Portugal.

| Antígenos | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão | Mediana | IC 99%        |
|-----------|--------|--------|-------|---------------|---------|---------------|
| AgFgT     | 0,047  | 1,115  | 0,468 | 0,259         | 0,423   | 0,384 – 0,552 |
| AgFhT     | 0,022  | 1,040  | 0,320 | 0,208         | 0,293   | 0,252 – 0,387 |
| AgFgD     | 0,019  | 1,426  | 0,493 | 0,299         | 0,421   | 0,396 – 0,590 |
| AgFhD     | 0,006  | 1,411  | 0,469 | 0,307         | 0,395   | 0,370 – 0,569 |

AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*, AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica*,  
 AgFhT – antígeno total de *F. hepatica* e AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

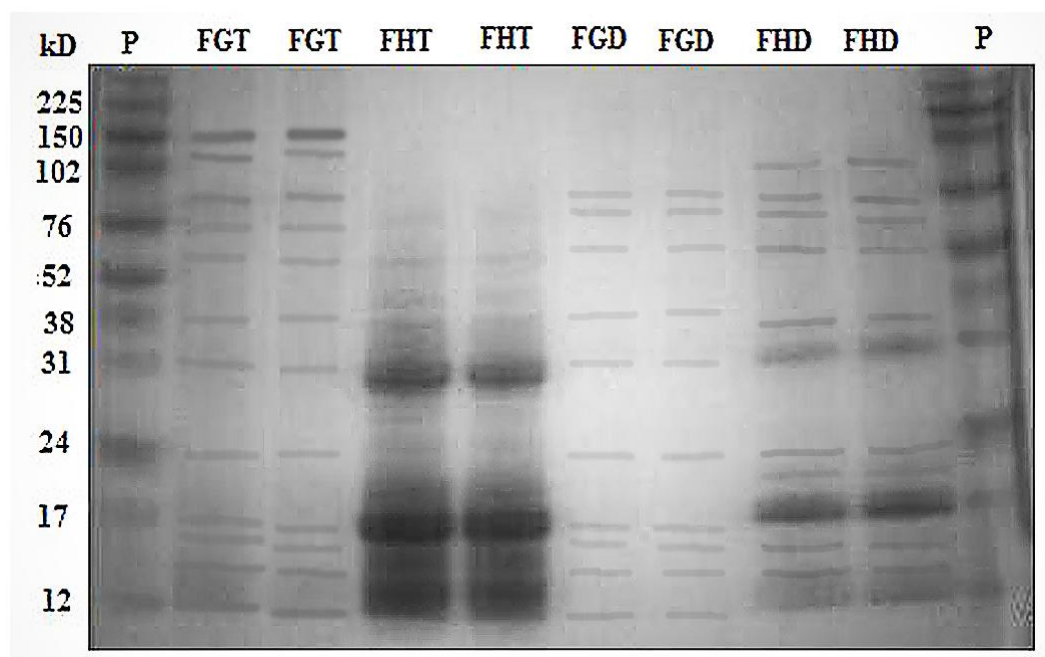


**Figura 23:** Diagrama de extremos e quartis dos *scores* das densidades ópticas dos quatro antígenos estudados, quando testados para o anticorpo IgG anti-*Fasciola*, em soros de indivíduos residentes em Portugal. AgFgT – antígeno total de *F. gigantica*; AgFhT – antígeno total de *F. hepatica*; AgFgD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* AgFhD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*. \*Diferenças estatisticamente significativas; \*\*Sem diferenças estatisticamente significativas.



## 6.6. Perfil electroforético das proteínas presentes nas preparações antigénicas – SDS-PAGE

Os antígenos (total e deslipidizado de *F. gigantica* e *F. hepatica*) foram analisados por SDS-PAGE utilizando um gel de poliacrilamida a 15%, em condição reduzida, revelando diferentes proteínas com pesos moleculares aproximados compreendidos entre os 12 e os 150 kDa (Figura 24).



**Figura 24:** Perfil electroforético dos antígenos em estudo em SDS-PAGE (mini gel 15%). P – padrão molecular, FGT – antígeno total de *F. gigantica*, FHT – antígeno total de *F. hepatica*, FGD – antígeno deslipidizado de *F. gigantica* e FHD – antígeno deslipidizado de *F. hepatica*.

O perfil das bandas foi bastante parecido nos diferentes antígenos estudados, sendo o antígeno deslipidizado de *F. gigantica*, o que apresentou o menor número de bandas. O antígeno total de *F. gigantica* e o deslipidizado de *F. hepatica* apresentaram fracções antigénicas de maior peso molecular. As bandas de peso moleculares de 22 e 36 kDa estiveram presentes apenas nos antígenos de *F. hepatica* (AgFhT e AgFhD) e, a banda de 102 kDa foi revelado nos antígenos total de *F. gigantica* e deslipidizado de *F. hepatica*. As fracções antigénicas de 28 e 150 kDa pareceram ser específicas dos antígenos totais de *F. hepatica* e *F. gigantica*, respectivamente (Quadro 10).

**Quadro 10:** Peso molecular das fracções antigénicas dos diferentes antígenos analisados (gel a 15%).

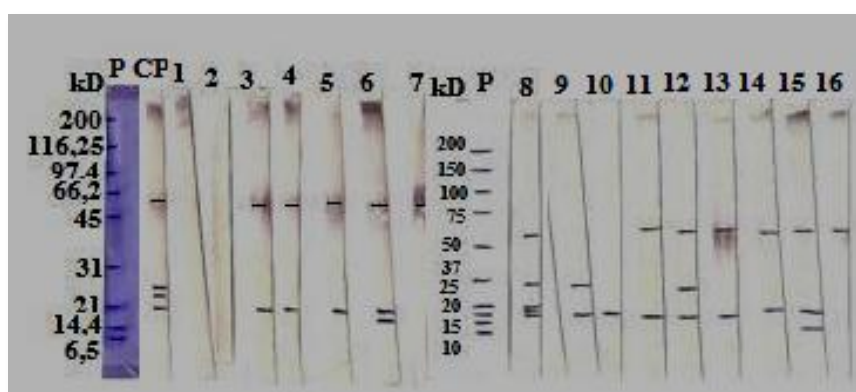
| Peso molecular das fracções antigénicas (kDa) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Antígenos                                     | 12 | 14 | 16 | 18 | 22 | 24 | 28 | 32 | 36 | 38 | 54 | 76 | 94 | 102 | 150 |
| AgFgT   | +  | +  | +  | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  | +  | +   | +   |
| AgFhT   | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    |     |     |
| AgFgD   | +  | +  | +  | +  |    | +  |    | +  |    | +  | +  | +  | +  |     |     |
| AgFhD   | +  | +  | +  | +  | +  | +  |    | +  | +  |    | +  | +  | +  | +   |     |

### 6.7. Avaliação da reactividade das fracções antigénicas por “Western-blot”

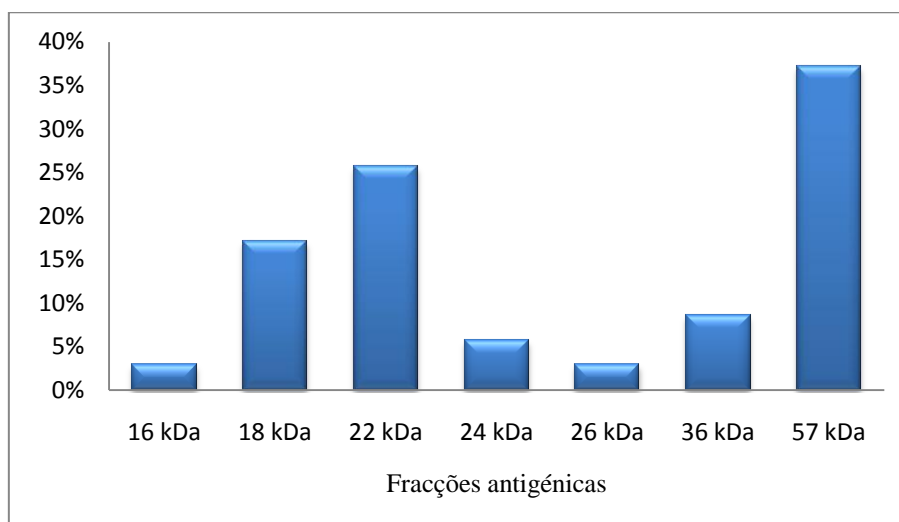
Com o objectivo de avaliar e identificar as fracções antigénicas que poderiam ser reconhecidas pelos soros dos indivíduos suspeitos da fasciolose, quando utilizado os anticorpos IgM e IgG anti-*Fasciola*, utilizou-se a técnica de “immunoblotting”.

#### 6.7.1. Antígeno Total de *F. gigantica* (AgFgT)

A utilização do antígeno total de *F. gigantica* na detecção do anticorpo IgG anti-*Fasciola*, permitiu identificar 7 bandas de diferentes pesos moleculares, compreendida entre 16 a 57 kDa, sendo que as bandas de 22 e 57 kDa, foram as que apareceram com maior frequência (Figuras 25 e 26).

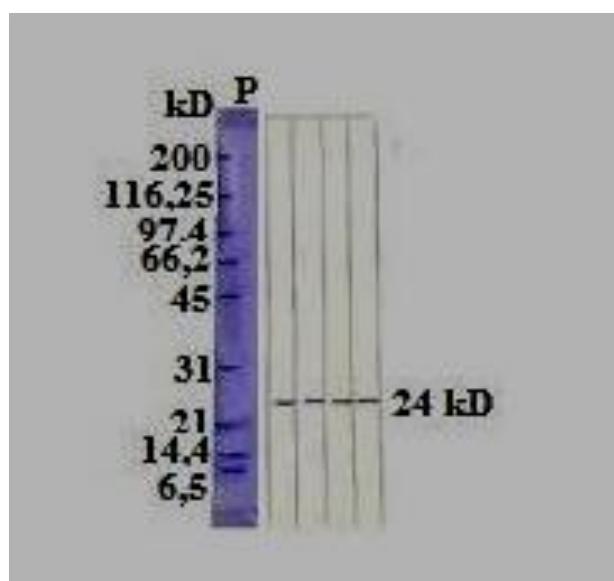


**Figura 25:** Fracções antigénicas de *F. gigantica* reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT). P – padrão de peso molecular; CP – controlo positivo; 1 – larva *migras* visceral; 2 – Cisticercose; 3 a 16 – soros de indivíduos com fasciolose confirmada.



**Figura 26:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT) reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*.

Ao testar o antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT) para IgM anti-*Fasciola*, evidenciou-se uma única banda de peso molecular de 24 kDa, reconhecida por apenas quatro soros (Figura 27).

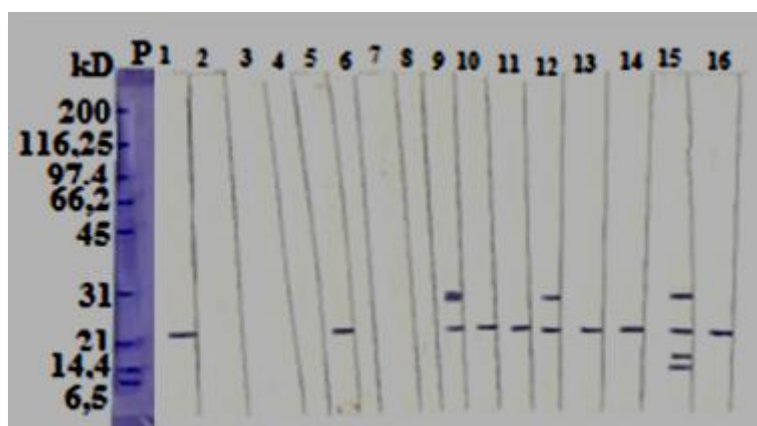


**Figura 27:** Fracções antigénicas de *F. gigantica* reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT).  
P-padrão de peso molecular.

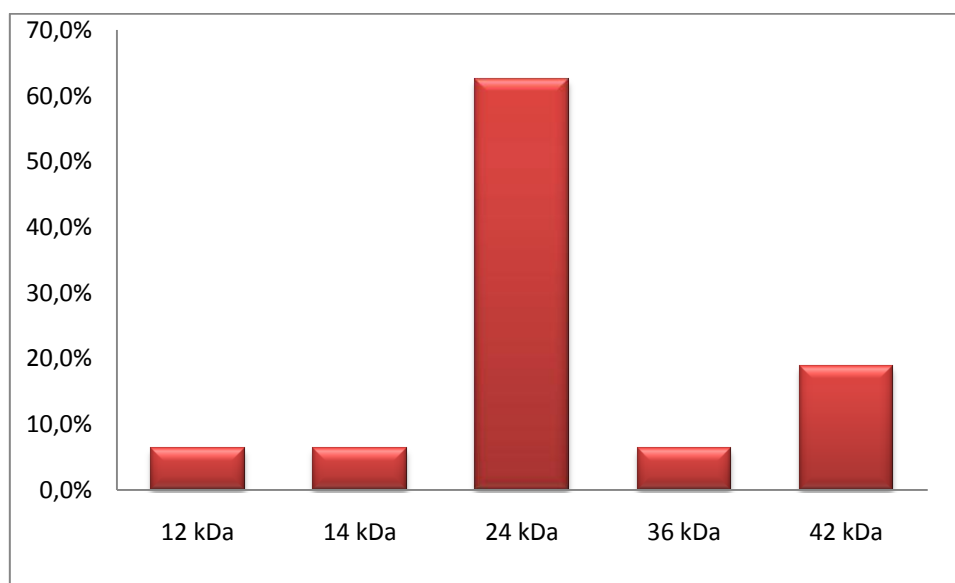
A comparação da reactividade do AgFgT (antígeno total de *F. gigantica*) para IgG e IgM anti-*Fasciola* nos soros dos indivíduos suspeitos de fasciolose, levou-nos a constatar a presença de uma única banda comum, a de 24 kDa, reactiva aos dois anticorpos (Figuras 26 e 27).

### 6.7.2. Antígeno Total de *F. hepatica* (AgFhT)

As fracções antigénicas do AgFhT que foram reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola* apresentaram peso molecular de 12 a 42 kDa, com a fracção de 24 kDa reconhecida pela maioria dos soros analisado, e comum ao antígeno total de *F. gigantica* para IgG e IgM. Este antígeno apresentou 3 proteínas antigénicas (12, 14 e 42 kDa) que não estiveram presentes no antígeno total de *F. gigantica* (Figuras 28 e 29).

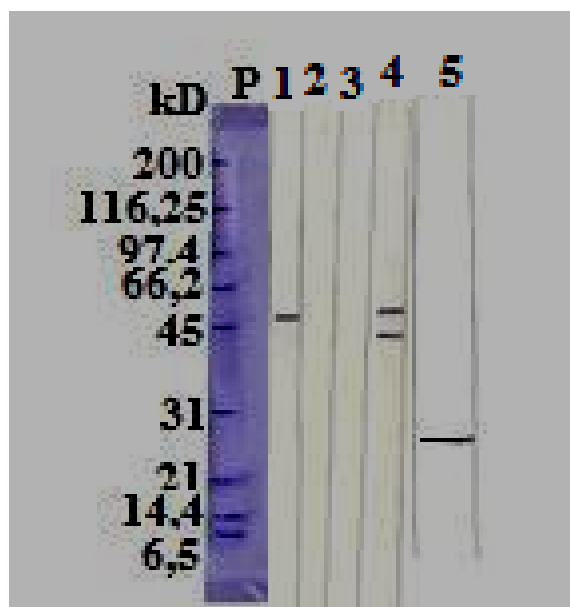


**Figura 28:** Fracções antigénicas de *F. hepatica* reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT). P (padrão molecular), 1 (controlo positivo), 2 (larva *migrans* visceral), 3 (cisticercose), 4 a 6 (soros duvidosos de Cabo Verde), 7 e 8 (soros duvidosos de Portugal), 9 a 12 (soros positivos de Cabo Verde), 14 a 16 (soros positivos de Portugal).

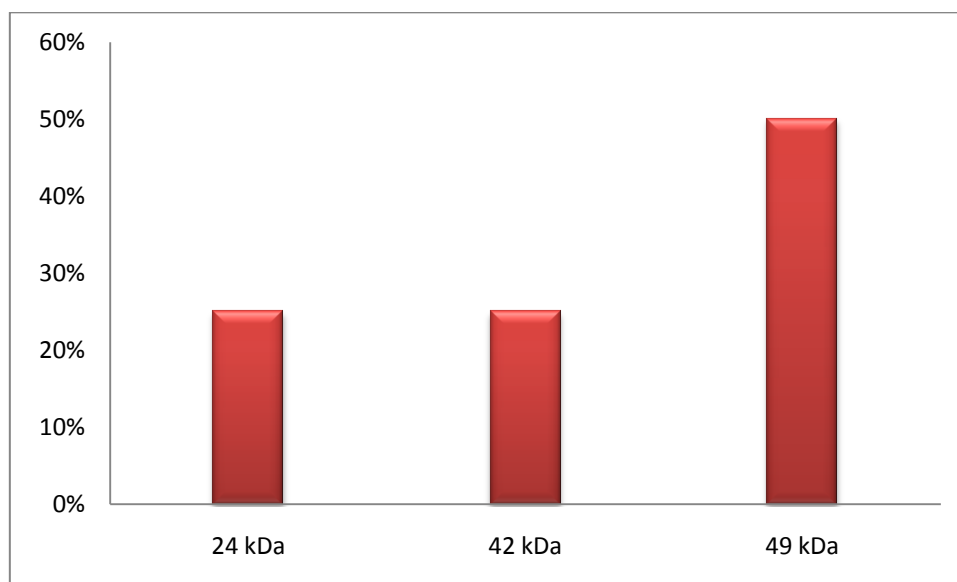


**Figura 29:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT) reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*.

Já na detecção do anticorpo IgM, as fracções antigénicas do AgFhT mais reactivas foram as de 24, 42 e 49 kDa (Figura 30), sendo a banda de 49 kDa a mais frequente (Figura 31).



**Figura 30:** Fracções antigénicas de *F. hepatica* reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT). P-padrão de peso molecular.

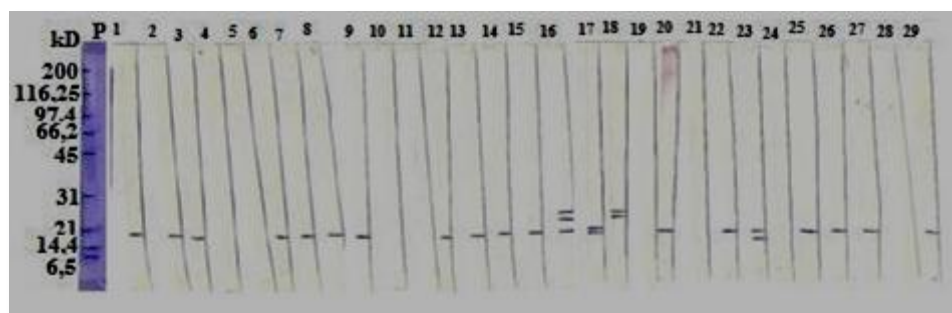


**Figura 31:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT) reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola*.

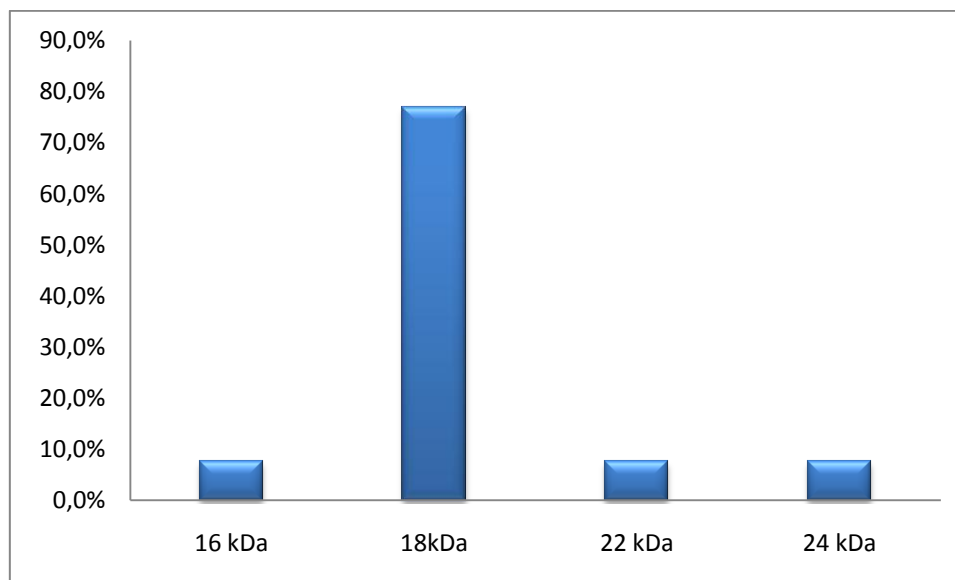
Na detecção de IgG e IgM anti-*Fasciola*, o antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT) revelou um perfil de fracções reactivas diferente, visto que, para o anticorpo IgG, evidenciou-se 3 bandas (12, 14 e 36 kDa) que não estiveram presentes quando testados para IgM (Figuras 29 e 31).

### 6.7.3. Antígeno Deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD)

Ao testar o antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD) para IgG anti-*Fasciola*, apareceram 4 bandas de peso molecular de 16 a 24 kDa (Figura 32). A banda de 18 kDa foi a mais frequente (Figura 33).

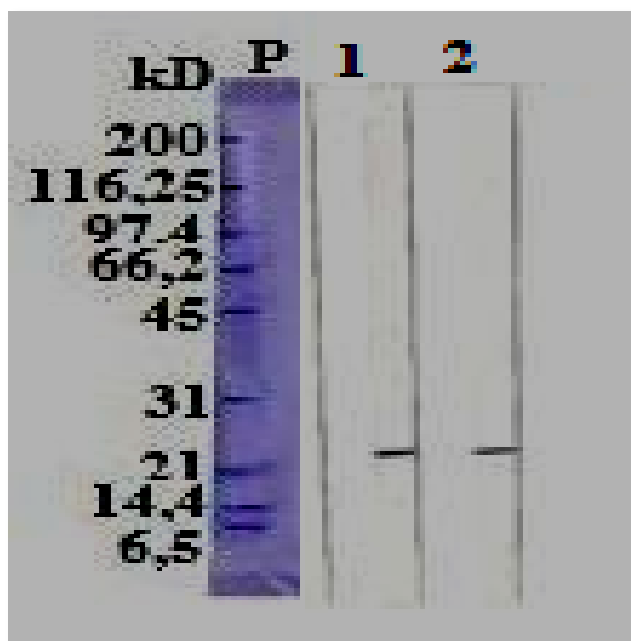


**Figura 32:** Fracções antigénicas de *F. gigantica* reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD). P (padrão molecular), 1 a 8 (soros positivos de Cabo Verde), 9 (controlo positivo), 10 (larva *migrans* visceral), 11 (cisticercose), 12 a 18 (soros positivos de Cabo Verde), 19 a 21 (soros duvidosos de Cabo Verde), 22 a 24 (soros positivos de Portugal), 25 a 27 (soros positivos de Cabo Verde), 28 e 29 (soros positivos de Portugal).



**Figura 33:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD) reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*.

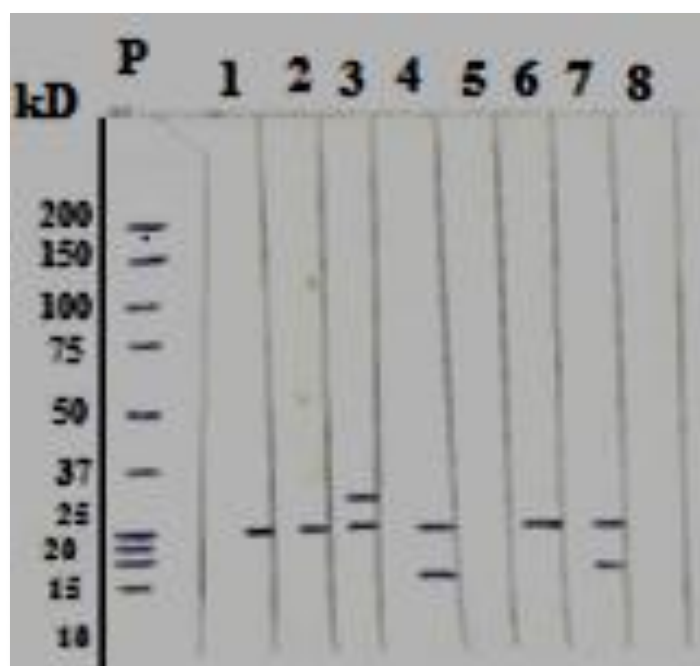
Na detecção do anticorpo IgM anti-*Fasciola* utilizando o antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD), a banda de 24 kDa foi a única reconhecida pelos soros dos indivíduos suspeitos de fasciolose (Figura 34). Os antígenos, completo e deslipidizado de *F. gigantica* revelaram um padrão de fracções reactivas idêntico para o anticorpo IgM anti-*Fasciola* (Figuras 27 e 34).



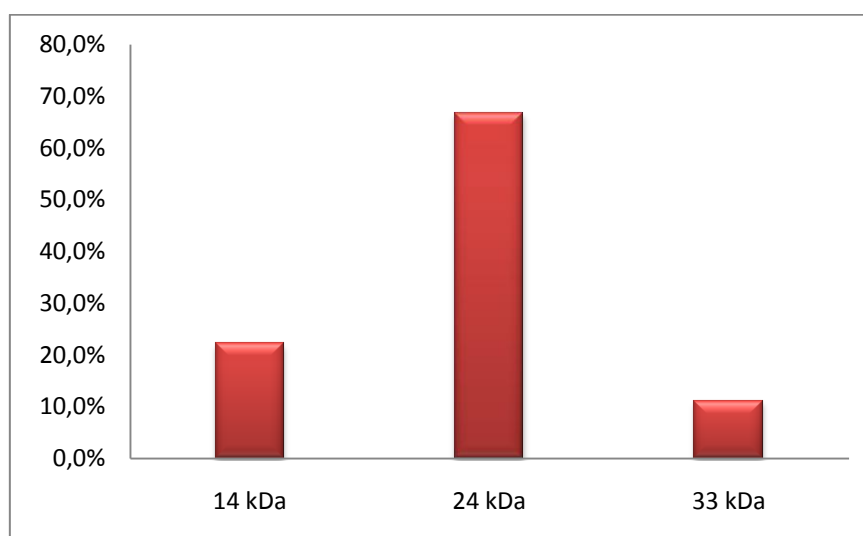
**Figura 34:** Fracções antigénicas de *F. gigantica* reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD). P – padrão de peso molecular.

#### 6.7.4. Antígeno Deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD)

A reactividade do AgFhD para IgG anti-*Fasciola* revelou 3 bandas com diferentes pesos moleculares (14, 24 e 33 kDa) (Figura 35), em que a fracção de 24 kDa foi a mais frequente (Figura 36).



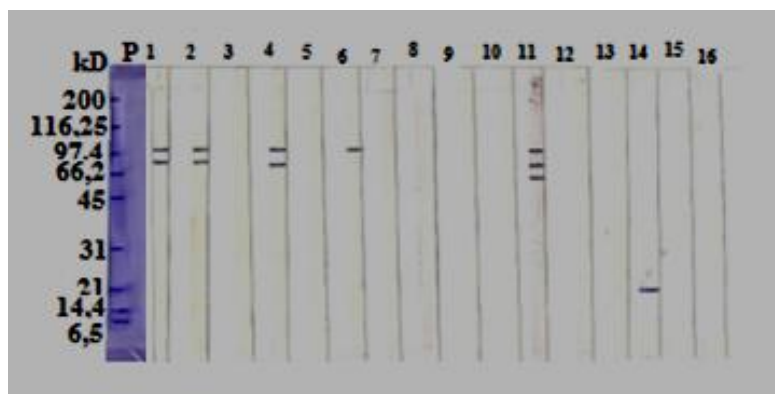
**Figura 35:** Fracções antigénicas de *F. hepatica* reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*, utilizando o antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD). P (padrão molecular), 1 e 2 (controlo positivo), 3 e 4 (soros positivos de Cabo Verde), 5 (soro duvidoso de Cabo Verde), 6 e 7 (soros positivos de Portugal), 8 (soro duvidoso de Portugal).



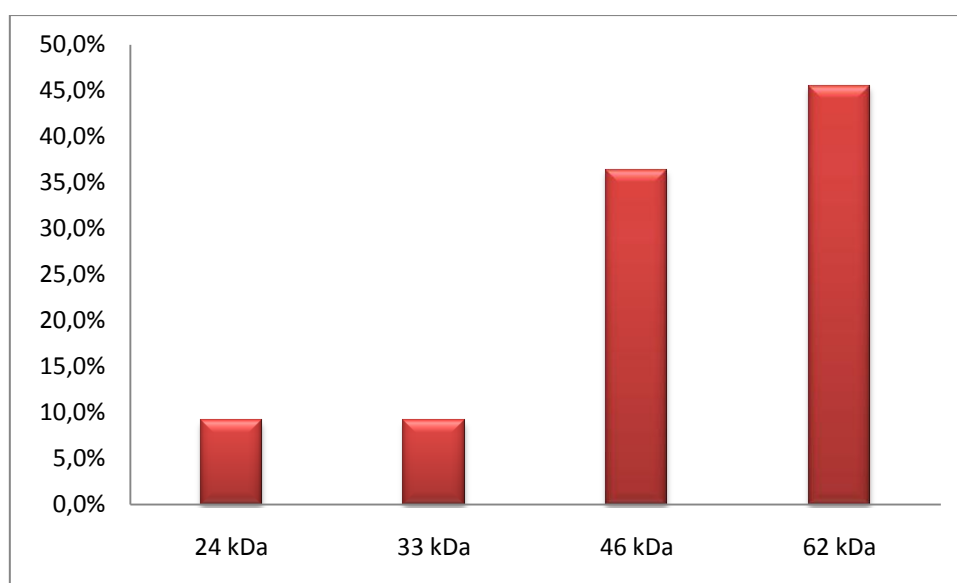
**Figura 36:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD) reconhecidas pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola*.



Na detecção do anticorpo IgM anti-*Fasciola*, as fracções do antígeno deslipidizado de *F. hepatica* que revelaram reactividade foram as de 24, 33, 46 e 62 kDa (Figura 37), e a banda de 62 kDa foi a mais frequente (Figura 38).



**Figura 37:** Fracções antigénicas de *F. hepatica* reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola* utilizando o antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD). P - padrão molecular.



**Figura 38:** Frequência das fracções antigénicas do antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD) reconhecidas pelo anticorpo IgM anti-*Fasciola*.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES



## 7. Discussão e Conclusões

O parasita *F. gigantica* é, aparentemente a principal espécie responsável pela fasciolose em Cabo Verde. A sua ocorrência nos animais foi assinalada na Ilha de Santiago desde o início da década de 70, séc. XX (Cruz e Silva *et al.*, 1972 e Cruz e Silva, 1974), bem como os primeiros casos diagnosticados de fasciolose humana em 1966 (Meira, 1966 e Meira & Santa-Rita, 1966). Contudo, a maioria das infecções humanas têm sido diagnosticadas fora do país, principalmente em França (Nozais *et al.*, 1998), Portugal (Grácio & Azevedo, 1998; Grácio, 1999 e Oliveira *et al.*, 2002), Estados Unidos da América (Graham *et al.*, 2001) e Senegal (Ka *et al.*, 2002), em emigrantes residentes nesses países ou em doentes que se deslocam para fazer o diagnóstico e tratamento de diversas patologias.

Poucos casos humanos foram identificados em Cabo Verde, devido à inexistência de métodos de diagnóstico laboratorial, nomeadamente os de imunodiagnóstico, uma vez que os métodos parasitológicos são pouco sensíveis sobretudo nos períodos pré-patente e crónico. Além disso, devido ao polimorfismo das manifestações clínicas aliado à pouca divulgação sobre a parasitose, não tem sido considerada a relevância da fasciolose em Saúde Pública.

Em relação ao imunodiagnóstico, diversos métodos têm sido aplicados, com destaque para a pesquisa de anticorpos pelos métodos serológicos, nomeadamente ELISA e Western-blot (WB) (Chauvin *et al.*, 1995; Fagbemi *et al.*, 1995; Hillyer *et al.*, 1996; Santiago & Hillyer, 1988; Duménigo *et al.*, 1999; Andrade-Sanchez *et al.*, 2000 e Rokni *et al.*, 2003), o que tem permitido proceder não só ao diagnóstico da infecção, como também avaliar a sua prevalência em regiões endémicas.

Apesar da contribuição dos métodos de imunodiagnóstico na melhoria do diagnóstico da fasciolose, eles ainda apresentam problemas relacionados com a falta de especificidade, devido à comunidade antigénica comum entre vários helmintas. Por isso, muitos estudos têm sido feitos, na tentativa de melhorar os problemas dessas técnicas. Métodos como ELISA e Western-blot, têm sido

desenvolvidos para a detecção da parasitose nas diversas fases da doença, utilizando diferentes produtos do parasita, tais como: antígenos somáticos e de excreção-secreção (Espino *et al.*, 1990; Gorman *et al.*, 1998; Carnevale *et al.*, 2001b; Yokananth *et al.*, 2005; El Ridi *et al.*, 2007 e Meshgi *et al.*, 2008), coproantígenos (Valero *et al.*, 2009), frações antigénicas purificadas ou glicoproteínas específicas das espécies de *Fasciola* (Gorman *et al.*, 1998; Maleewong *et al.*, 1999; Intapan *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008 e Nguyen *et al.*, 2010), subclasses de imunoglobulinas (Maher *et al.*, 1999 e Belo & Grácio, 2003), anticorpos monoclonais contra frações antigénicas ou glicoproteínas específicos das espécies de *Fasciola* (Chaithirayanon *et al.*, 2002; Sirisriro *et al.*, 2002 e Anuracpreeda *et al.*, 2010) e antígenos recombinantes (Watpan *et al.*, 2005 e Awad *et al.*, 2009).

No presente estudo, apenas foram encontrados vermes adultos de *F. gigantica* nos bovinos examinados em dois Concelhos da Ilha de Santiago, Cabo Verde o que corrobora os resultados de outros estudos realizados em Cabo Verde (Rosa *et al.*, 2002; Semedo, 2006; Pile *et al.*, 2006 e Matos, 2008). As preparações antigénicas utilizadas no estudo foram obtidas daqueles parasitas.

Assim, foram produzidos dois antígenos (somático e deslipidizado), de *F. gigantica* de Cabo Verde (AgFgT e AgFgD) avaliados comparativamente a dois de *F. hepatica* de Portugal (AgFhT e AgFhD), que foram testados em simultâneo em soros de indivíduos cabo-verdianos e de indivíduos residentes em Portugal, suspeitos da fasciolose.

Com base nos resultados do método de Micro-ELISA, constatamos que com a utilização de antígenos homólogos se obtém maior especificidade do que com os heterólogos, visto que, os antígenos somáticos e deslipidizados de *F. gigantica*, quanto testados em soros de indivíduos cabo-verdianos, demonstraram maior reactividade do que os antígenos complementares de *F. hepatica* e vice-versa.

Quanto aos anticorpos testados (IgG e IgM), os diferentes antígenos apresentaram resultados distintos. Apesar da sensibilidade (100%) ter sido idêntica com as preparações antigénicas totais de

*F. gigantica* (AgFgT) e *F. hepatica* (AgFhT) na detecção de IgG anti-*Fasciola*, a especificidade foi de 95,2% e 90,5%, respectivamente.

Resultados similares foram obtidos por Awad *et al.*, (2009) num estudo efectuado em bovinos, ovinos e asininos, em que obtiveram valores de sensibilidade de (96,7%, 100% e 93,3%) e especificidade de (80%, 83,3% e 85,2%), respectivamente, utilizando antígenos somáticos de *F. gigantica*.

Quanto a IgM anti-*Fasciola*, os valores de sensibilidade e especificidade foram de 97% e 90,5%, respectivamente, para os antígenos totais dos dois parasitas (AgFgT e AgFhT) (Figuras 14 e 15). Esses valores são superiores aos obtidos com antígeno de excreção-secreção de *F. hepatica* por Belo e Grácio (2003), que encontraram valores de sensibilidade de 47% e especificidade de 77,8%.

À semelhança dos antígenos totais, os antígenos deslipidizados (AgFgD e AgFhD), demonstraram uma sensibilidade de 100% (Figura 15). Contudo, a especificidade foi superior (95,2%) quando se utilizou o antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD) em relação à obtida com *F. gigantica* (AgFgD), cujo valor foi de 90,5% na detecção de IgG (Figura 14).

Na pesquisa de IgM anti-parasita, as sensibilidades foram de 94% e 83% para AgFgD e AgFhD, respectivamente, com uma especificidade de 90,5% para ambos os antígenos deslipidizados (Figuras 14 e 15).

Em relação às preparações antigénicas deslipidizadas, parece não serem alvo de investigações recentes, uma vez que na revisão de literatura que se fez, não se encontrou trabalhos onde utilizaram esses antígenos, por isso, não nos foi possível comparar os nossos resultados com outros estudos.

Apesar dos antígenos de *F. gigantica* apresentarem menor concentração de proteínas que os correspondentes de *F. hepatica* (Quadro 3), o título de anticorpos IgM e IgG foi significativamente superior (Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ), com o antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT), comparativamente ao de *F. hepatica* (AgFhT), tanto nos soros de indivíduos cabo-verdianos (Figuras 18 e 19) como nos de indivíduos residentes em Portugal (Figuras 22 e 23). Estes resultados

sugerem que os antígenos de *F. gigantica* sejam mais reactivos do que os de *F. hepatica*. Em relação às preparações antigénicas deslipidizadas (AgFgD e AgFhD), não se verificaram diferenças na expressão de IgM e IgG (Mann-Whitney,  $p>0,001$ ), nos soros testados, independentemente da sua origem (Figuras 18, 19, 22 e 23).

O maior número de soros positivos para IgM anti-*Fasciola*, sugere que a maioria dos indivíduos estaria na fase aguda da infecção. A detecção simultânea destes dois anticorpos poderá contribuir para um diagnóstico mais confiável.

As reacções cruzadas das preparações antigénicas estudadas neste trabalho com soros de doentes com larva *migrans* visceral e com *A. lumbricoides* podem ser explicadas pela existência de epitopos antigénicos comuns entre vários parasitas helmintas e pelo facto desses parasitas coexistirem na área de estudo.

O facto das preparações antigénicas de *F. gigantica* apresentarem menor concentração de proteínas, poderá explicar a razão pela qual os antígenos de *F. hepatica* se revelarem com maior intensidade no gel de poliacrilamida (Figura 24), utilizado no presente estudo. Além disso, a análise do perfil electroforético das fracções antigénicas revelou um padrão distinto nos quatro antígenos.

Relativamente aos antígenos totais, o antígeno de *F. gigantica* (AgFgT) apresentou doze fracções antigénicas que variaram entre os 12 e os 150 kDa, aproximadamente. O antígeno correspondente de *F. hepatica* (AgFhT) revelou o mesmo número de bandas, mas essas variaram entre os 12 e os 76 kDa. Estes dois antígenos revelaram nove polipeptídeos comuns (Quadro 10).

Trabalhos realizados com antígenos totais de *F. gigantica* e *F. hepatica* (Yokananth *et al.*, 2005; Meshgi *et al.*, 2008 e Awad *et al.*, 2009), demonstraram bandas comuns às encontradas neste estudo (16, 18, 22, 24, 32, 36, 38, 54, 76, 94 e 150 kDa).

Quanto às preparações antigénicas deslipidizadas, o antígeno de *F. gigantica* (AgFgD) apresentou o menor número de bandas (dez) compreendidas entre os 12 e os 94 kDa e, o de *F. hepatica* (AgFhD) evidenciou doze fracções antigénicas, compreendidas entre os 12 e os 102 kDa,

sendo nove dessas bandas comuns entre esses dois antígenos (Quadro 10). As bandas de 12, 14, 16, 18, 24, 32, 54 e 76 kDa foram comuns para as quatro preparações antigénicas estudadas.

A imunoreactividade das fracções antigénicas para IgM e IgG foi testada por *Immunoblotting*. No antígeno total de *F. gigantica* (AgFgT), as moléculas de 18, 22, 36 e 57 kDa foram as reconhecidas com mais frequência pelo anticorpo IgG anti-*Fasciola* (Figura 26), enquanto que para IgM a molécula de 24 kDa foi a única banda reactiva (Figura 27). Apenas a fracção de 24 kDa reagiu com as duas classes de imunoglobulinas.

Em relação ao antígeno total de *F. hepatica* (AgFhT), na detecção de IgG e IgM anti-*Fasciola* parece haver uma similaridade no padrão de reactividade (Figura 29), sendo as fracções de 24 e 42 kDa as reconhecidas com mais frequência pelos dois anticorpos e a de 49 kDa apenas detectada com IgM.

Relativamente ao antígeno deslipidizado de *F. gigantica* (AgFgD), a banda de 18 kDa foi a mais reactiva na detecção de IgG (Figura 33) e a de 24 kDa foi a única fracção reactiva para IgM (Figura 34). Quanto à reactividade do antígeno deslipidizado de *F. hepatica* (AgFhD), as bandas de 14 e 24 kDa foram as mais frequentes na detecção de IgG (Figura 36) e as bandas de 46 e 62 kDa na detecção de IgM (Figura 38).

Um aspecto relevante evidenciado nos quatro antígenos foi a presença da banda de 24 kDa na detecção dos dois anticorpos utilizados em estudo, IgM e IgG anti-*Fasciola*.

Estudos dessa natureza são importantes, uma vez que através de investigações mais aprofundadas a nível da bioquímica, biologia molecular, engenharia genética, etc, torna-se possível desenvolver meios de diagnóstico com maior especificidade e reprodutibilidade, tais como proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais, etc. A caracterização das fracções comuns e em particular a de 24 kDa, poderá contribuir significativamente para o desenvolvimento dos referidos meios diagnósticos.



A fracção de 26 kDa parece ser uma glicoproteína específica de *F. gigantica*. Portanto, esta glicoproteína poderá ser um alvo de mais estudos, o que provavelmente permitirá um diagnóstico diferencial entre as duas espécies de *Fasciola*.

Os resultados desse estudo, levam-nos a surgir a necessidade de estudos mais alargados em todas as ilhas de Cabo Verde, com o objectivo de saber a verdadeira situação desta parasitose no país, conhecer os possíveis reservatórios existentes no território e para além disso, confirmar se existem as duas espécies de *Fasciola* ou se, de facto, *F. gigantica* é a única espécie presente no arquipélago.

A presença do parasita, do hospedeiro intermediário (*L. natalensis*), de reservatórios bovinos confirmados e da existência de casos humanos no país, faz com que seja necessário uma tomada de medidas de controlo da doença, sensibilizar os médicos e a população em geral para a parasitose, uma vez que esta doença está presente, mas no entanto é desconhecida devido à sua pouca divulgação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 8. Referências bibliográficas

- ABDEL TAWAB, A.H., SHAHAT, S.A., ABDOU, M., METWALLY, K.M. & WOODWARD, S.R., 2000. DNA sequence polymorphisms in two strains of *Fasciola hepatica* from Egypt and Europe. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **30** (3): 821-828.
- ABDEL TAWAB, A.H., EL-GARHY, M.F. & HECKMANN, R.A., 2006. Molecular polymorphisms associated with Egyptian, European, Chinese and North American *Fasciola hepatica*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **36** (2): 389-396.
- ACHA, P.N. & SZYFRES, B., 1986. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales* (2<sup>a</sup> ed.), Organización Panamericana de La Salud, Washington, D.C., E.U.A., 989 pp.
- ADLARD, R.D., BARKER, S.C., BLAIR, D. & CRIBB, T.H., 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of *Fasciolidae* (Digenea). *International Journal for Parasitology*, **23** (3): 423-425.
- AGATSUMA, T., ARAKAWA, Y., IWAGAMI, M., HONZAKO, Y., CAHYANINGSIH, U., KANG, S.Y. & HONG, S. J., 2000. Molecular evidence of natural hybridization between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Parasitology International*, **49** (3): 231-238.
- ALCALA-CANTO, Y., IBARRA-VELARDE, F., SUMANO-LOPEZ, H., GRACIA-MORA, J. & ALBERTI-NAVARRO, A., 2006. Dose-response inhibition of proteolytic activity by a cysteine protease inhibitor in a murine model of fasciolosis. *Parasitology Research*, **98** (5): 438-442.
- ALCALA-CANTO, Y., IBARRA-VELARDE, F., SUMANO-LOPEZ, H., GRACIA-MORA, J. & ALBERTI-NAVARRO, A., 2007. Effect of a cysteine protease inhibitor on *Fasciola hepatica* (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden, and size in experimentally infected sheep. *Parasitology Research*, **100** (3): 461-465.
- ALLAN, J.E. & MACDONALD, A.S., 1998. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol.*, **20** (5): 241-247.
- ALLAM, A.F., EL-AGAMY EL, S.I. & HELMY, M.H., 2002. Molecular and immunological characterization of *Fasciola* species. *British Journal of Biomedical Science*, **59** (4): 191-195.
- AMARAL, I., 1964. Santiago de Cabo Verde. A Terra e os Homens. *Memórias, Junta de Investigações do Ultramar, Lisboa*, **48**: 15-19.
- ANDRADE-SANCHEZ, R., SILVA-PAZ, A., PANADERO, S.R., BANOS-DIEZ, P. & MORRONDO, P., 2000. Use of a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (SEA) for the diagnosis of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle from Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, **93** (1): 39-46.
- ANURACPREEDA, P., SONGKOOMKRONG, S., SETHADAVIT, M., CHOTWIWATTHANAKUN, C., TINIKUL, Y. & SOBHON, P., 2010. *Fasciola gigantica*: Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant cathepsin B3. *Experimental Parasitology*, doi: 10.1016/j.exppara.2010.08.012.
- APT, W., AGUILERA, X., VEGA, F., MIRANDA, C., ZULANTAY, I., PEREZ, C., GABOR, M.

- & APT, P., 1995. Treatment of human chronic fascioliasis with triclabendazol: drug efficacy and serologic response. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52** (6): 532-535.
- ASPÖCK, H., AUER, H. & PICHER, O., 1999. Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in Central Europe. *Helminthologia*, **36** (3): 139-145.
- AWAD, W.S., IBRAHIM, A.K. & SALIB, F.A., 2009. Using indirect ELISA to assess different antigens for the serodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle, sheep and donkeys. *Research in Veterinary Science*, **86** (3): 466-471.
- BARGUES, M.D., FUNATSU, I.R., OVIEDO, J.A. & MAS-COMA, S., 1996. Natural water, an additional source for human infection by *Fasciola hepatica* in the Northern Bolivian Altiplano. *Parasitologia*, **38** (1-2): 251.
- BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S., 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **14** (5): 569-577.
- BARGUES, M.D., MANGOLD, A.J., MUÑOZ-ANTOLI, C., POINTIER, J.P. & MAS-COMA, S., 1997. SSU rDNA characterization of lymnaeid snails transmitting human fascioliasis in South and Central America. *The Journal of Parasitology*, **83** (6): 1086-1092.
- BARGUES, M.D., VIGO, M., HORAK, P., DVORAK, J., PATZNER, R.A., POINTIER, J.P., JACKIEWICZ, M., MEIER-BROOK, C. & MAS-COMA, S., 2001. European *Lymnaeidae* (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection Genetics and Evolution*, **1** (2): 85-107.
- BARGUES, M.D., HORAK, P., PATZNER, R.A., POINTIER, J.P., JACKIEWICZ, M., MEIER-BROOK, C. & MAS-COMA, S., 2003. Insights into the relationships of Palaearctic and Nearctic lymnaeids (Mollusca: Gastropoda) by rDNA ITS-2 sequencing and phylogeny of stagnicoline intermediate host species of *Fasciola hepatica*. *Parasite*, **10** (3): 243-255.
- BARGUES, M.D., ARTIGAS, P., JACKIEWICZ, M., POINTIER, J.P. & MAS-COMA, S., 2005. In: GLÖER, P. & FALKNER, G. Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline *Lymnaeidae* (Gastropoda) Beiträge zur Süßwasser-Malakologie - Festschrift für Claus Meier-Brook und Hans D. Boeters, *Heldia (Münchner Malakologische Mitteilungen)*, **6** (1-2): 57-68.
- BEHM, C.A. & SANGSTER, N.C., 1999. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1<sup>a</sup> Ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 185-224 pp.
- BELO, S. & GRÁCIO, M.A.A., 2003. Possibilidade de aplicação de IgG<sub>4</sub> no imunodiagnóstico da fasciolose humana. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **10** (1): 84-85.
- BENNET-JENKINS, E. & BRYANT, C., 1996. Novel sources of anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, **26** (8-9): 937-947.
- BENTANCOR, A., PIACENZA, L. & CARMONA, C., 2002. Immunization with cathepsin L proteinases CL1 and CL2 secreted by *Fasciola hepatica* elicit a preferential type 1 response based on IgG2a antibodies in rats. *Journal of Helminthology*, **76** (3): 199-205.
- BOGITSH, B.J., CARTER, C.E. & OELTMANN, T.N., 2005. *Human Parasitology* (3<sup>a</sup> Ed.),

Elsevier Academic Press, London, 459 pp.

- BORAY, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, **7** (1): 95-120.
- BORAY, J.C., 1982. Fascioliasis. In: HILLYER, G.V. & HOPLA, C.E. Handbook series in zoonoses, section C. Parasitic zoonoses. *CRC Press, Boca Raton, FL*, **3**: 71-88.
- BOSSAERT, K., FARNIR, F., LECLIPTEUX, T., PROTZ, M., LONNEUX, J.F. & LOSSON, B., 2000a. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **87** (2-3): 103-123.
- BOSSAERT, K., JACQUINET, E., SAUNDERS, J., FARNIR, F. & LOSSON, B., 2000b. Cell mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **88** (1-2): 17-34.
- BOUCHET, F., 1991. Etude parasitologique: recherche de oeufs d'helminthes dans les fosses et dépotoirs du site des Jardins du Carrousel. In: Rapport du Ministère de la Culture, de la Communication et des Grands Travaux. *Les Jardins du Carrousel à Paris Fouilles*, 165-171 pp.
- BOUCHET, F., 1994. Analyse parasitologique des Logis de la Cour des Suisses. *Les Dossiers d'Archéologie*, **190**: 87-93.
- BOUCHET, F., 1995a. La Paléoparasitologie au Grand Louvre. *Association des Anciens Elèves de L'Institut Pasteur*, **37**: 8-11.
- BOUCHET, F., 1995b. Recovery eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris France). *The Journal of Parasitology*, **80**: 785-786.
- BOUCHET, F., 1997. Les oeufs d'helminthes: éléments traces des parasitoses néolithique et paléolithique en sites français. *C.R. Soc. Biol. Fil.*, **191** (4): 529-536.
- BOUCHET, F., BENTRAD, S. & PAICHELER, J.C., 1998. Enquête épidémiologique sur les helminthiases à la cour de Louis XIV. *Médecine/Sciences*, **14**: 463-466.
- BOUCHET, F., HARTER, S. & LE BAILLY, M., 2003. The state of the art of palaeoparasitological research in the old World. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** (1): 95-101.
- BRADFORD, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, **72** (1-2): 248-254.
- BRADY, M.T., O'NEILL, S.M., DALTON, J.P. & MILLS, K.H., 1999. *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against Bordetella pertussis. *Infection and Immunity*, **67** (10): 5372-5378.
- BRAGA, F.R., 2008. Acção *in vitro* de fungos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*. Dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 67 pp.

- BUCHON, P., CUENCA, H., QUITON, A., CAMACHO, A.M. & MAS-COMA, S., 1997. Fascioliasis in cattle in the human high endemic region of the Bolivian Northern Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, **57** (2): 71-83.
- CARNEVALE, S., RODRIGUEZ, M.I., GUARNERA, E.A., CARMONA, C., TANOS, T. & ANGEL, S.O., 2001a. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cysteine proteinase. *Diagnostic Microbiology and Infection Diseases*, **41**: 43-49.
- CARNEVALE, S., RODRÍGUEZ, M.I., SANTILLÁN, G., LABBÉ, J.H., CABRERA, M.G., BELLEGARDE, E.J., VELÁSQUEZ, J.N., TRGOVCIC, J.E. & GUARNERA, E.A., 2001b. Immunodiagnosis of Human Fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Micro-ELISA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8** (1): 174-177.
- CERVI, L., RUBINSTEIN, H. & MASI, D.T., 1996. Involvement of excretion-secretion products from *Fasciola hepatica* inducing suppression of the cellular immune responses. *Veterinary Parasitology*, **61** (1-2): 97-111.
- CERVI, L., BORGONOVO, J., EGEE, M., CHIAPELLO, L. & MASI, D., 2004. Immunization of rats against *Fasciola hepatica* using crude antigens conjugated with Freund's adjuvant or oligodeoxynucleotides. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **97** (1-2): 97-104.
- CHAITHIRAYANON, K., WANICHANON, C., VICHASRI-GRAMS, S., ARDSEUNGNEON, P., GRAMS, R., VIYANANT, V., UPATHAM, E.S. & SOBHON, P., 2002. Production and characterization of a monoclonal antibody against 28.5 kDa tegument antigen of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica*, **84** (1): 1-8.
- CHATTERJEE, K.D., 1975. *Fasciola hepatica*. In: CHATTERJEE, K.D. *Parasitology (Protozoology and Helminthology)* (10<sup>a</sup> Ed.), S.N. Guha Ray At Sree Saraswaty Press Ltd, Calcutta, 146-148 pp.
- CHAUVIN, L., BOUVET, G. & BOULARD, C.H., 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. *International Journal for Parasitology*, **25** (10): 1227-1241.
- CHEN, M.G. & MOTT, K.E., 1990. Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review of recent literature. *Tropical Diseases Bulletin*, **87** (4): 1-38.
- CHO, S.Y., LEE, N.S., SHIN, M.H. & KONG, Y., 1999. Age-dependent infectivity of orally transferred juvenile *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, **85** (4): 739-742.
- CLERY, D., TORGERSON, P. & MULCAHY, G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, **62** (1-2): 71-82.
- CORDOVA, M., HERRERA, P., NOPO, L., BELLATIN, J., NAQUIRA, C., GUERRA, H. & ESPINOZA, J.R., 1997. *Fasciola hepatica* cysteine proteinases: immunodominant antigens in human fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **57** (6): 660-666.
- CORDOVA, M., REATEGUI, L. & ESPINOZA, J.R., 1999. Immunodiagnosis of human fascioliasis with *Fasciola hepatica* cysteine proteinases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93** (1): 54-57.
- CORNELISSEN, J.B., GAASENBEEK, C.P., BOERSMA, W., BORGSTEEDE, F.H. & VAN

- MILLINGEN, F.J., 1999. Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal for Parasitology*, **29** (5): 685-696.
- CORNELISSEN, J.B., GAASENBEEK, C.P., BORGSTEEDE, F.H., HOLLAND, W.G., HARMSSEN, M.M. & BOERSMA, W., 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. *International Journal for Parasitology*, **31** (7): 728-737.
- COSTA, F.L., 1996. Processos erosivos actuais na bacia da Ribeira Seca (Santiago oriental – Cabo Verde). *Garcia de Orta Série de Geografia*, **15** (1): 29-34.
- CRUZ E SILVA, J.A., MENDONÇA, M.M. & ROQUE, M.M.A., 1972. A fasciolose dos bovinos na Ilha de Santiago. Esquema para a sua erradicação. *Revista Centro de Estudos de Cabo Verde*, **1** (1): 23-32.
- CRUZ E SILVA, J.A., 1974. Estudos de parasitologia em Cabo Verde (resultados da missão realizada em Dezembro de 1972 - Janeiro de 1973). *Garcia de Orta Série de Zoologia*, **3** (1): 21-34.
- CURTALE, F., HASSANEIN, Y.A.E., EL WAKEEL, A., MAS-COMA, S. & MONTRESOR, A., 2003. Distribution of human fascioliasis by age and gender among rural population in the Nile Delta. *Egyptian Journal of Tropical Pediatrics*, **49** (5): 264-268.
- DALTON, J.P. & MULCAHY, G., 2001. Parasite vaccines – a reality? *Veterinary Parasitology*, **98** (1-3): 149-167.
- DALTON, J.P., NEILL, S.O., STACK, C., COLLINS, P., WALSH, A., SEKIYA, M., DOYLE, S., MULCAHY, G., HOYLE, D., KHAZNADJI, E., MOIRE, N., BRENNAN, G., MOUSLEY, A., KRESHCENKO, N., MAULE, A.G. & DONNELLY, S.M., 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, **33** (11): 1173-1181.
- DAN, M., LICHTENSTEIN, D., LAVOCHKIN, J., STAVOROWSKY, M., JEDWAB, M. & SHIBOLET, S., 1981. Human fascioliasis in Israel, an imported case. *Israel Journal of Medical Sciences*, **17** (6): 430-432.
- DAR, Y.D., RONDELAUD, D. & DREYFUSS, G., 2005. Update of fasciolosis-transmitting snails in Egypt (review and comment). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **35** (2): 477-490.
- DE ALBUQUERQUE, L.G.M. & SANTOS, M.E.M., 2001. *História Geral de Cabo Verde*, volume I (2ª Ed.), Lisboa: IICT. Centro de Estudos de História e Cartografia Antiga; Praia: Instituto Nacional de Investigação Cultural, 478 pp.
- DE OLIVEIRA, N.V.B., 2007. *Fasciola hepatica* um problema que ainda preocupa a inspecção sanitária. Trabalho apresentado para o cumprimento das actividades finais referentes ao TCC da Especialização *Latu sensu* em Higiene e inspecção dos produtos de origem animal, Rio de Janeiro, Brasil, 43 pp.
- DITTMAR, K. & TEEGEN, W.R., 2003. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saale-Unstrut Valley,



- Germany. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98** (1): 141-143.
- DOMMELIER, S., BENTRAD, S., BOUCHET, F., PAICHELER, J.C. & PETREQUIN, P., 1998. Parasitoses liées à l'alimentation chez les populations du site néolithique de Chalais (Jura, France). *Anthropozoologica*, **27** (1-4): 41-49.
- DOSAY-AKBULUT, M., TRUDGETT, A. & STANHOPE, M., 2005. Understanding genetic diversity of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Z Naturforsch C*, **60** (9-10): 774-778.
- DREYFUSS, G., MOUKRIM, A., RONDELAUD, D. & VAREILLE-MOREL, C., 1994. Field observations concerning infection of *Lymnaea palustris* by *Fasciola hepatica*. *Journal of Helminthology*, **68** (2): 115-118.
- DREYFUSS, G., ABROUS, M. & RONDELAUD, D., 2000. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, **86** (1): 158-160.
- DREYFUSS, G., VIGNOLES, P., AROUS, M. & RONDELAUD, D., 2002. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite*, **9** (2): 113:120.
- DUMÉNIGO, B., ESPINO, A., FINLAY, C. & MEZA, M., 1999. Kinetics of antibody - based antigen detection in serum and faeces of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology, Amsterdam*, **86** (1): 23-31.
- DUNN, A., 1983. *Helminthología veterinaria* (2ª Ed.), El Manual Moderno, México, 112-137 pp.
- DZIK, J.M., 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica*, **53** (1): 33-64.
- ECHEVARRIA, F., 2004. Fasciolose. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **13**: 100-102.
- EL RIDI, R., SALAH, M., WAGIH, A., WILLIAM, H., TALLIMA, H., EL SHAFIE, M.H., KHALEK, T.A., EL AMIR, A., ABO AMMOU, F.F. & MOTAWI, H., 2007. *Fasciola gigantica* excretory-secretory products for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, **149** (3-4): 219-228.
- EL SAYED, M.H., ALAM, A.F. & OSMAN, M.M., 1997. Prevention of human fascioliasis: a study on the role of acids detergents and potassium permanganate in clearing salads from metacercariae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **27** (1): 163-169.
- EL-BAHY, N.M., 1998. Strategic control of fascioliasis in Egypt. Review article. Submitted to the Continual Scientific Committee of Pathology, Microbiology and Parasitology. In: MAHA F.M.S., 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries*, **2** (3): 182-189.
- EL-KOUBA, M.M.A.N., 2005. Aspectos gerais da Fasciolose e das Endoparasitoses em capivaras (*Hidrochaeris hidrochaeris* - Linnaeus, 1766) e ratões de banhado (*Myocastor coypus* - Molina, 1782) residentes em três parques do estado do Paraná. Tese de Mestrado em Ciências Veterinárias, Sector de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná,

Curitiba, Brasil, 73 pp.

- EL-MORSHEDY, H., FARGHALY, A., SHARAF, S., ABOU-BASHA, L. & BARAKAT, R., 1999. Triclabendazole in the treatment of human fascioliasis: a community-based study. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **5** (5): 888-894.
- ENGEL, J.C., DOYLE, P.S., HSIEH, I. & MCKERROW, J.H., 1998. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, **188** (4): 725-734.
- ERK, N., 1977. A study of Kitab al-Hail Wal-Baitaram written in the second half of the 9th century by Muhammed Ibn Ahi Hizam. *His. Medicine Veterinary*, **1**: 101-104.
- ESPINO, A.M., MARCET, R. & FINLAY, C.M., 1990. Detection of Circulating Excretory Secretory Antigens in Human Fascioliasis by Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **28** (12): 2637-2640.
- ESTEBAN, J.G., FLORES, A., AGUIRRE, C., STRAUSS, W., ANGLES, R. & MAS-COMA, S., 1997a. Presence of very high prevalence and intensity of infection with *Fasciola hepatica* among Aymara children from the Northern Bolivian Altiplano. *Acta Tropica*, **66** (1): 1-14.
- ESTEBAN, J.G., FLORES, A., ANGLES, R., STRAUSS, W., AGUIRRE, C. & MAS-COMA, S., 1997b. A population-based coprological study of human fascioliasis in a hyperendemic area of the Bolivian Altiplano. *Tropical Medicine and International Health*, **2** (7): 695-699.
- ESTEBAN, J.G., BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S., 1998. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, **58** (1): 13-42.
- ESTEBAN, J.G., FLORES, A., ANGLES, R. & MAS-COMA, S., 1999. High endemicity of human fascioliasis between Lake Titicaca and La Paz valley, Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **93** (2): 151-156.
- ESTEBAN, J.G., GONZALEZ, C., BARGUES, M.D., ANGLES, R., SANCHEZ, C., NAQUIRA, C. & MAS-COMA, S., 2002. High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Peru. *Tropical Medicine and International Health*, **7** (4): 339-348.
- ESTEBAN, J.G., GONZALEZ, C., CURTALE, F., MUNÑOZ-ANTOLI, C., VALERO, M.A., BARGUES, M.D., EL SAYED, M., EL WAKEEL, A., ABDEL-WAHAB, Y., MONTRESOR, A., ENGELS, D., SAVIOLI, L. & MAS-COMA, S., 2003. Hyperendemic fascioliasis associated with schistosomiasis in villages of the Nile Delta, Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **69** (4): 429-437.
- FAGBEMI, B.O., OBARISIAGBON, I.O. & MBUH, J.V., 1995. Detection of circulating antigen in sera of *Fasciola gigantica* infected cattle with antibodies reactive with a *Fasciola*-specific 88 kDa antigen. *Veterinary Parasitology*, **58** (3): 235-246.
- FAIRWEATHER, I. & BORAY, J.C., 1999. Fasciolicides: efficacy, action, resistance and its management. *The Veterinary Journal*, **158** (2): 81-112.
- FARAG, H.F. & EL SAYAD, M.H., 1995. *Biomphalaria alexandrina* naturally infected with *Fasciola gigantica* in Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*

Hygiene, **89** (1): 36.

- FERNANDEZ, C.S.A., FRAGA, J., POINTIER, J.P., YONG, M., SANCHEZ, J., COUSTAU, C.H., GUTIERREZ, A. & THERON, A., 2004. Detection and genetic distance of resistant populations of *Pseudosuccinea columella* (Mollusca: *Lymnaeidae*) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) using RAPD markers. *Acta Tropica*, **92** (1): 83-87.
- GAASENBEEK, C.P.H., MOLL, L., CORNELISSEN, J.B.W.J., VELLEMA, P. & BORGSTEEDE, F.H.M., 2001. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, **95** (1): 37-43.
- GASNIER, N., RONDELAUD, D., ABROUS, M., CARRERAS, F., BOULARD, C., DIEZ-BAÑOS, P. & CABARET, J., 2000. Allopatric combination of *Fasciola hepatica* and *Lymnaea truncatula* is more efficient than sympatric ones. *International Journal for Parasitology*, **30** (5): 573-578.
- GHOSH, S., RAWAT, P., VELUSAMY, R., JOSEPH, D., GUPTA, S.C. & SINGH, B.P., 2005. 27 kDa *Fasciola gigantica* Glycoprotein for the diagnosis of prepatent fasciolosis in cattle. *Veterinary Research Communications*, **29** (2): 123-135.
- GIL-BENITO, A., CIOLKOVITCH, A., MAS-COMA, S. & QUILICI, M., 1991. Enquête sur la Distomatose à *Fasciola hepatica* en Corse. *Mediterranean Medicine Marseille*, **403**: 21-25.
- GOMES, I.F.B., 2006. A política de descentralização dos serviços de saúde em Cabo Verde 1975/2000. Tese de Doutorado. Praia: Instituto da Biblioteca Nacional e do Livro, 187 pp.
- GORMAN, T., SANCHEZ, R., FERNANDO, F. & ALCAINO, H., 1998. Imunodiagnostico de fasciolosis bovina mediante ELISA e western blot. *Parasitologia Al dia*, **22** (1-2): 1-6.
- GRÁCIO, M.A. & AZEVEDO, V., 1998. Human fascioliasis in Cabo Verde: Diagnosis and clinical manifestations. 2<sup>nd</sup> European Congress on Tropical Medicine of the Federation of European Societies for Tropical Medicine and International Health and 4<sup>th</sup> Residential Meeting of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Liverpool, UK, P. 140.
- GRÁCIO, M.A., 1999. Fasciose humana em Cabo Verde: casos diagnosticados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Lisboa, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **2** (1-2): 87-88.
- GRAHAM, C.S., BRODIE, S.B. & WELLER, P.F., 2001. Imported *Fasciola hepatica* infection in the United States and treatment with triclabendazole. *Clinical Infection Diseases*, **33** (1): 1-5.
- GROCK, R., MORALES, G., VACA, J.L. & MAS-COMA, S., 1998. Fascioliasis in sheep in the human high endemic region of the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, **58** (2): 95-101.
- GUOBADIA, E.E. & FAGBEMI, B.O., 1997. The isolation of *Fasciola gigantica*-specific antigens and their use in the serodiagnosis of fasciolosis in sheep by the detection of circulating antigens. *Veterinary Parasitology*, **68** (3): 269-282.
- GUTIERREZ, A., POINTIER, J.P., YONG, M., SANCHEZ, J. & THERON, A., 2003a. Evidence of phenotypic differences between resistant and susceptible isolates of *Pseudosuccinea columella* (Gastropoda: *Lymnaeidae*) to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) in Cuba.

- Parasitology Research*, **90** (2): 129-134.
- GUTIERREZ, A., POINTIER, J.P., FRAGA, J., JOBET, E., MODAT, S., PEREZ, R.T., YONG, M., SANCHEZ, J., LOKER, E.S. & THERON, A., 2003b. *Fasciola hepatica*: identification of molecular markers for resistant and susceptible *Pseudosuccinea columella* snail hosts. *Experimental Parasitology*, **105** (3-4): 211-218.
- HASEEB, A.N., EL-SHAZLY, A.M., ARAFA, M.A. & MORSY, A.T., 2002. A review on fascioliasis in Egypt. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, **32** (1): 317-354.
- HASHIMOTO, K., WATANOBE, T., LIU, C. X., INIT, I., BLAIR, D., OHNISHI, S. & AGATSUMA, T., 1997. Mitochondrial DNA and nuclear DNA indicate that the Japanese *Fasciola* species is *F. gigantica*. *Parasitology Research*, **83** (3): 220-225.
- HEGAZI, A.G., ABD EL HADY, F.K. & SHALABY, H.A., 2007. An *in vitro* effect of propolis on adult worms of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, **144** (3-4): 279-286.
- HILLYER, G.V., SOLER, G.M., RODRÍGUEZ-PÉREZ, J., BJORLAND, J., SILVA, L.M., RAMÍREZ, G.S. & BRYAN, R.T., 1992. Use of the falcon assay screening test enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46** (5): 603-609.
- HILLYER, G.V., SOLAR DE GALANES, M., BUCHON, P. & BJORLAND, J., 1996. Herd evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of *Fasciola hepatica* infection in sheep and cattle from the Atiplano of Bolivia. *Veterinary Parasitology*, **61** (3-4): 211-220.
- HILLYER, G.V. & APT, W., 1997. Food-borne trematode infections in the Americas. *Parasitology Today*, **13**: 87-88.
- HILLYER, G.V., 1999. Immunodiagnosis of human and animal fasciolosis. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1ª Ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 435-447 pp.
- HILLYER, G.V., 2005. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology*, **79** (3): 241-247.
- HOPKINS, D.R., 1992. Homing in on helminths. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **46** (6): 626-634.
- HUANG, W.Y., HE, B., WANG, C.R. & ZHU, X.Q., 2004. Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology*, **120** (1-2): 75-83.
- IKEDA, T., 1998. Cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59** (2): 286-290.
- INE, 2008. IV Recenseamento geral da população e da habitação. Documento de Projecto. Instituto Nacional de Estatística, Praia, Cabo Verde, 57 pp.
- INTAPAN, P.M., MALLEWONG, W., WONGKHAM, C., TOMANAKARN, K., IEAMVITEEVANICH, K., PIPITGOOL, V. & SUKOLAPONG, V., 1998. Excretory-

- secretory antigen components of adult *Fasciola gigantica* recognized by infected human sera. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **29** (3): 579-583.
- INTAPAN, P.M., MALEEWONG, W., NATEEWORANART, S., WONGKHAM, C., PIPITGOOL, V., SUKOLAPONG, V. & SANGMANEEDET, S., 2003. Immunodiagnosis of human fascioliasis using an antigen of *Fasciola gigantica* adult worm with the molecular mass of 27 kda by a DOT-ELISA. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **34** (4): 713-717.
- INTAPAN, P.M., SADEE, P., WONGKHAM, C. & MALEEWONG, W., 2004. Development of rapid agglutination test using *Fasciola gigantica* specific antigen for serodiagnosis of human fascioliasis. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **35** (1): 313-317.
- ITAGAKI, T. & TSUTSUMI, K., 1998. Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *International Journal for Parasitology*, **28** (5): 777-781.
- ITAGAKI, T., TSUTSUMI, K.I., ITO, K. & TSUTSUMI, Y., 1998. Taxonomic status of the Japanese triploid forms of *Fasciola*: comparison of mitochondrial ND1 and COI sequences with *F. hepatica* and *F. gigantica*. *The Journal of Parasitology*, **84** (2): 445-448.
- ITAGAKI, T., KIKAWA, M., SAKAGUCHI, K., SHIMO, J., TERASAKI, K., SHIBAHARA, T. & FUKUDA, K., 2005a. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology*, **131** (5): 679-685.
- ITAGAKI, T., KIKAWA, M., TERASAKI, K., SHIBAHARA, T. & FUKUDA, K., 2005b. Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **67** (11): 1115-1118.
- JAYRAW, A.K., SINGH, B.P., RAINA, O.K. & UDAYA KUMAR, M., 2009. Kinetics of serum immunoglobulin isotype response in experimental bovine tropical fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, **165** (1-2): 155-160.
- KA, M.M., MBENGUE, M., DIOP, B.M., POUYE, A., DA VEIGA, J.A., DIA, D., WELLE, A., NDIR, O. & DIOP, T.M., 2002. Two unexpected cases of hepatobiliary fascioliasis in Dakar (Senegal). *Dakar Med*, **47** (2): 202-205.
- KAMAL, S.M. & EL SAYED, K.K., 2006. Immune modulation by helminthic infections: worms and viral infections. *Parasite Immunology*, **28** (10): 483-496.
- KEISER, J., SHU-HUA, X., TANNER, M. & UTZINGER, J., 2006a. Artesunate and artemether are effective fasciolicides in the rat model and *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57** (6): 1139-1145.
- KEISER, J., UTZINGER, J., TANNER, M., DONG, Y. & VENNERSTROM, J.L., 2006b. The synthetic peroxide OZ78 is effective against *Echinostoma caproni* and *Fasciola hepatica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58** (6): 1193-1197.
- KEISER, J. & UTZINGER, J., 2009. Food-Borne Trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews*,

22(3): 466-483.

KENDALL, S.B., 1965. Relationships between the species of *Fasciola* and their molluscan hosts. *Advances in Parasitology*, **3**: 59-98.

KESMAT, M., RASHIKA, E.L.R., AMAL, N.E., MAGED, E.L.G., HAGER, S., ZEINAB, S. & HANAA, I.H., 1999. Parasite-specific antibody profile in human fascioliasis: application for immunodiagnosis of infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61** (5): 738-742.

KUMAR, N., GHOSH, S. & GUPTA, S.C., 2008. Detection of *Fasciola gigantica* infection in buffaloes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitology Research*, **104** (1): 155-161.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** (5259): 680-685.

LANE, G., 1998. Anthelmintic resistance. *Veterinary Record*, **143**: 332.

LAVAZEC, C., NATTIER, V., DOMMELIER, S., BENTRAD, S., PAICHELER, J.C. & BOUCHET, F., 2000. Etude de la parasitofaune du site médiéval de Charavines (Lac de Paladru France). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, **125**: 205-215.

LAW, R.H., SMOOKER, P.M., IRVING, J.A., PIDRAFITA, D., POINTING, R., KENNEDY, N.J., WHISSTOCK, J.C., PIKE, R.N. & SPITHILL, T.W., 2003. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infection and Immunity*, **71** (12): 6921-6932.

LECAILLON, J.B., GOBDILLON, J. & CAMPESTRINI, J., 1998. Effect of food on bioavailability of triclabendazole in patients with fascioliasis. *British Journal and Clinical Pharmacology*, **45** (6): 601-604.

LEE, C.G., ZIMMERMAN, G.L. & BISHOP, J.K., 1992a. Host influence on the banding profiles of whole-body protein and excretory-secretory product of *Fasciola hepatica* (Trematoda) by isoelectric focusing. *Veterinary Parasitology*, **41** (1-2): 57-68.

LEE, C.G., ZIMMERMAN, G.L. & MULROONEY, D.M., 1992b. Isoelectric focusing of soluble proteins from *Fasciola hepatica* L, 1758 and *Fascioloides magna* B, 1875. *American Journal of Veterinary Research*, **53** (2): 246-250.

LEE, C.G., ZIMMERMAN, G.L. & WEE, S.H., 1992c. *Fasciola hepatica*: comparison of flukes from Korea and the United States by isoelectric focusing banding patterns of wholebody protein. *Veterinary Parasitology*, **42** (3-4): 311-316.

LEE, C.G. & ZIMMERMAN, G.L., 1993. Banding patterns of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* (Trematoda) by isoelectric focusing. *The Journal of Parasitology*, **79** (1): 120-123.

LIN, R.Q., DONG, S.J., NIE, K., WANG, C.R., SONG, H.Q., LI, A.X., HUANG, W.Y. & ZHU, X.Q., 2007. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. *Parasitology Research*, **101** (3): 813-817.

LOTFY, W.M., EL-MORSHEDY, H.N., ABOU EL-HODA, M., EL-TAWILA, M.M., OMAR, E.A. & FARAG, H.F., 2002. Identification of the Egyptian species of *Fasciola*. *Veterinary*

*Parasitology*, **103** (4): 323-332.

- LOFTY, W.M. & HILLYER, G.V., 2003. *Fasciola* species in Egypt. *Experimental Pathology and Parasitology*, **6**: 9-22.
- LOFTY, W.M., BRANT, S.V., DEJONG, R.J., LE, T.H., DEMIASZKIEWICZ, A., RAJAPAKSE, J.R.P.V., PERERA, V.B.V.P., LAURSEN, J.R. & LOKER, E.S., 2008. Evolutionary Origins, Diversification, and Biogeography of Liver Flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79** (2): 248-255.
- LUZ, E., GAZDA, C.M. & YADA, R.S., 1992. Fasciolose animal no Estado do Paraná – análise de dados. *Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba*, **35** (4): 777-780.
- MAHER, K., EL RIDI, R., ELHODA, A.N., EL-GHANNAM, M., SHAHEEN, H., SHAKER, Z. & HASSANEIN, H.I., 1999. Parasite-specific antibody profile in human fascioliasis: application for immunodiagnosis of infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61** (5): 738-742.
- MALEEWONG, W., INTAPAN, P.M., WONGKHAM, C., TOMANAANKAN, K., DAENSEEKAEW, W. & SUKEEPASARNJAROEN, W., 1996. Comparison of adult somatic and excretory-secretory antigens in enzyme-linked immuno-sorbent assay for diagnosis of human infection with *Fasciola gigantica*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **27** (3): 566-569.
- MALEEWONG, W., WONGKHAM, C., INTAPAN, P.M. & PIPITGOL, V., 1999. *Fasciola gigantica*-specific antigens: purification by a continuous-elution method and its evaluation for the diagnosis of human fascioliasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **61** (4): 648-651.
- MALEK, E.A., 1980. Snail-transmitted parasitic diseases. *Boca Raton, FL, CRC Press*, **2**: 1-324.
- MARCILLA, A., BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S., 2002. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and Cellular Probes*, **16** (5): 327-333.
- MAS-COMA, S., ANGLES, R., STRAUSS, W., ESTEBAN, J.G., OVIEDO, J.A. & BUCHON, P., 1995. Human fascioliasis in Bolivia: a general analysis and a critical review of existing data. *Research and Reviews in Parasitology*, **55** (2): 73-93.
- MAS-COMA, S. & BARGUES, M.D., 1997. Human liver flukes: a review. *Research and Reviews in Parasitology*, **57** (3-4): 145-218.
- MAS-COMA, M.S., RODRIGUEZ, A., BARGUES, M.D., VALERO, M.A., COELHO, J.R. & ANGLES, R., 1997. Secondary reservoir role of domestic animals other than sheep and cattle in fascioliasis transmission in the Northern Bolivian Altiplano. *Research and Reviews in Parasitology*, **57**: 39-46.
- MAS-COMA, M.S., ESTEBAN, J.G. & BARGUES, M.D., 1999a. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, **77** (4): 340-346.
- MAS-COMA, S., BARGUES, M.D. & ESTEBAN, J.G., 1999b. Human Fasciolosis. *In*:

- DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1ª Ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 411-434 pp.
- MAS-COMA, S., ANGLES, R., ESTEBAN, J.G., BARGUES, M.D., BUCHON, P., FRANKEN, M. & STRAUSS, W., 1999c. The Northern Bolivian Altiplano: a region highly endemic for human fascioliasis. *Tropical Medicine and International Health*, **4** (6): 454-467.
- MAS-COMA, S., BARGUES, M.D., MARTY, A.M. & NEAFIE, R.C., 2000. Hepatic trematodiasis. In: MEYERS, W.M., NEAFIE, R.C., MARTY, A.M. & WEAR, D.J. *Pathology of Infectious Diseases, Vol. 1 Helminthiasis* (1ª Ed.), Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology, Washington DC, 69-92 pp.
- MAS-COMA, S., FUNATSU, I.R. & BARGUES, M.D., 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, **123**: 115-127.
- MAS-COMA, S., BARGUES, M.D., VALERO, M.A. & FUENTES, M.V., 2003. Adaptation capacities of *Fasciola hepatica* and their relationships with human fascioliasis: from below sea level up to the very high altitude. In: COMBES, C. & JOURDANE, J. *Taxonomy, Ecology and Evolution of Metazoan Parasites* (Eds.). *Perpignan University Press, Perpignan*, **2**: 81-123.
- MAS-COMA, S., 2004. *Human Fascioliasis*, Chapter 19, 305-322 pp. In: World Health Organization (WHO). *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*. Edited by J.A. Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer, and V.P.J. Gannon. Published by IWA Publishing, London, UK, 506 pp.
- MAS-COMA, S., BARGUES, M.D. & VALERO M.A., 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, **35** (11-12): 1255-1278.
- MASSOUD, A., EL SISI, S., SALAMA, O. & MASSOUD, A., 2001. Preliminary study of therapeutic efficacy of a new fasciolicidal drug derived from *Commiphora molmol* (myrrh). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **65** (2): 96-99.
- MATOS, L.M.M., 2008. Taxa de Ocorrência e Redistribuição Geopolítica da Fasciolose hepática na ilha de Santiago, Cabo Verde. Monografia para a obtenção de grau de Licenciatura em Engenharia do Ambiente, Instituto de Investigação e Desenvolvimento Agrário (INIDA) – Centro de Formação Agrária (CFA), Universidade de Cabo Verde, 34 pp.
- MATTOS, M.J., UENO, H. & GONÇALVES, A., J.E.M., 1977. Ocorrência estacional e biotecnologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, *Lymnaeidae*) em habitat natural no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, **6**: 240-250.
- MCMANUS, D.P. & DALTON, J.P., 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, **133**: 43-61.
- MEIRA, M., 1966. Um caso de fasciolíase hepática humana na ilha de Santiago. *Colóquio da Amelpo, Lisboa*.
- MEIRA, M. & SANTA-RITA, V., 1966. Um caso de fasciolíase subcutânea humana em Santiago. *Colóquio da Amelpo, Lisboa*.
- MENARD, A., AGOULON, A., L'HOSTIS, M., RONDELAUD, D., COLLARD, S. & CHAUVIN, A., 2001. *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France.



*Veterinary Research*, **32** (5): 499–508.

- MENDES, E.A., 2006. Comportamento e desenvolvimento de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) de bovinos naturalmente infectados em sagüi (*Callithrix penicillata*) e gerbil (*Meriones unguiculatus*). Tese de Mestrado em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Belo Horizonte, Brasil, 127 pp.
- MESHGI, B., ESLAMI, A. & HEMMATZADEH, F., 2008. Determination of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University*, **9** (1): 77-80.
- MILLAN, J.C., MULL, R., FREISE, S. & RICHTER, J., 2000. The efficacy and tolerability of triclabendazole in Cuban patients with latent and chronic *Fasciola hepatica* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **63** (5-6): 264-269.
- MILLER, C.M.D., HOWELL, M.J. & BORAY, J.C., 1993. Host effects of glutathione s-transferase activity in *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, **23** (8): 1073–1076.
- MITCHELL, G.B., MARIS, L. & BONNIWELL, M.A., 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary Record*, **143** (14): 399.
- MITCHELL, G.B., 2002. Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*, **24**: 378-385.
- MOLINA, E.C., 2005. Comparison of host-parasite relationships of *Fasciola gigantica* infection in cattle (*Bos indicus*) and swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). Tese de Doutorado, School of Tropical Veterinary and Biomedical Sciences, James Cook University, Australia, 146 pp.
- MOLL, L., GAASENBEEK, C.P.H., VELLEMA, P. & BORGSTEEDE, F.H.M., 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Record*, **91** (1-2): 153-158.
- MOROZOVA, E.V., CHRISANFOVA, G.G., ARKHIPOV, I.A. & SEMYENOVA, S.K., 2004. Polymorphism of the *ND1* and *COI* mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Russian Journal of Genetics*, **40** (7): 1002-1005.
- MOTAWEA, S.M., EL GILANY, A., MASSOUD, A., RIZK, H., EL SHAZLY, A.M. & GABALLAH, M., 2001. An epidemiological study of fascioliasis in a rural area in Dakahlia Governorate. *Journal of Environmental Sciences*, **21**: 31-62.
- MULCAHY, G., O'CONNOR, F., MCGONIGLE, S., DOWD, A., CLERY, D.G., ANDREWS, S.J. & DALTON, J.P., 1998. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, **16** (9-10): 932-939.
- MULCAHY, G., JOYCE, P. & DALTON, J.P., 1999a. Immunology of *Fasciola hepatica* infection. In: DALTON, J. P. *Fasciolosis* (1ª Ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 341-376 pp.
- MULCAHY, G., O'CONNOR, F., CLERY, D., HOGAN, S.F., DOWD, A.J., ANDREWS, S.J. & DALTON, J.P., 1999b. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science*, **67** (1): 27-33.
- MULCAHY, G. & DALTON, J.P., 2001. Cathepsin L proteinases as vaccines against infection

- with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants. *Research in Veterinary Science*, **70** (1): 83-86.
- NEVES, D.P., 2005. *Parasitologia Humana* (11<sup>a</sup> Ed.), Editora Atheneu, São Paula, 494 pp.
- NEYRA, V., CHAVARRY, E. & ESPINOZA, J.R., 2002. Cysteine proteinases Fas1 and Fas2 are diagnostic markers for *Fasciola hepatica* infection in alpacas (*Lama pacos*). *Veterinary Parasitology*, **105** (1): 21-32.
- NGUYEN, T.G.T., VAN DE, N., VERCRUYSE, J., DORNY, P. & HOA LE, T., 2009. Genotypic characterization and species identification of *Fasciola* spp. with implications regarding the isolates infecting goats in Vietnam. *Experimental Parasitology*, **123** (4): 354-361.
- NGUYEN, T.G., LE, T.H., DE, N.V., DOAN, T.T., DAO, T.H., VERCRUYSE, J. & DORNY, P., 2010. Assessment of a 27-kDa antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of fasciolosis in Vietnamese patients. *Tropical Medicine and International Health*, **15** (4): 462-467.
- NITHIUTHAI, S., ANANTAPHRUTI, M.T., WAIKAGUL, J. & GAJADHAR, A., 2004. Waterborne zoonotic helminthiasis. *Veterinary Parasitology*, **126** (1-2): 167-193.
- NOLAN, M.J. & CRIBB, T.H., 2005. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in Parasitology*, **60**: 101-163.
- NORBURY, L.J., 2008. Structure, Function and Evolutionary Studies of *Fasciola* Cathepsin L-like Proteases. Thesis of Doctor of Philosophy, Applied Biology and Biotechnology School of Applied Science, Engineering and Technology Portfolio RMIT University, Melbourne, Australia, 392 pp.
- NOZAI, J.P., THOMAS, I., BRICAIRE, F., DANIS, M. & GENTILINI, M., 1998. Apropos of 1 case of hepatogastric fascioliasis in Cape Verde. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, **91** (2): 148-50.
- O'BRIEN, D.J., 1998. Fasciolosis: a threat to livestock. *Irish Veterinary Journal*, **51**: 539-541.
- O'NEILL, S.M., PARKINSON, M., STRAUSS, W., ANGLES, R. & DALTON, J.P., 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* (fascioliasis) in a human population in the Bolivian Altiplano using purified cathepsin L cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58** (4): 417-423.
- O'NEILL, S.M., PARKINSON, S.M., DOWD, A.J., STRAUSS, W., ANGLES, R. & DALTON, J.P., 1999. Short report: Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60** (5): 749-751.
- O'NEILL, S.M., BRADY, M.T., CALLANAN, J.J., MULCAHY, G., JOYCE, P., MILLS, K.H. & DALTON, J.P., 2000. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunology*, **22** (3): 147-155.
- OLIVEIRA, L., CORREDOURA, A.S., BEATO, V., MORAES, F., SOUSA, S., PINHEIRO, N., DA GRAÇA, J.P. & ABECASIS, P., 2002. Fasciolíase hepática humana tratada com

- triclabendazol. *Medicina Interna*, **9** (1): 39-42.
- OVEREND, D.J. & BOWEN, F.L., 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal*, **72** (7): 275-276.
- OVIEDO, J.A., BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S., 1996. The intermediate snail host of *Fasciola hepatica* on the Mediterranean island of Corsica. *Research and Reviews in Parasitology*, **56**: 217-220.
- PANACCIO, M. & TRUDGETT, A., 1999. Molecular biology. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1<sup>a</sup> Ed.), CABI Publishing, Wallingford, UK, 449-464 pp.
- PANTELOURIS, E.M., 1965. The common liver fluke *Fasciola hepatica*. Oxford, Eng., Pergamon Press (*International series of Monographs on Pure and applied Biology Zoology Division*), vol. **21**.
- PERIAGO, M.V., VALERO, M.A., EL SAYED, M., ASHRAFI, K., EL WAKEEL, A., MOHAMED, M.Y., DESQUESNES, M., CURTALE, F. & MAS-COMA, S., 2008. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infection Genetics and Evolution*, **8** (1): 51-58.
- PÊSSOA, S.B. & MARTINS, A.V., 1982. *Parasitologia Médica* (11<sup>a</sup> Edição), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 460 pp.
- PIEDRAFITA, D., SPITHILL, T.W., DALTON, J.P., BRINDLEY, P.J., SANDEMAN, M.R., WOOD, P.R. & PARSONS, J.C., 2000. Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing *in vitro* by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, **22** (6): 287-295.
- PIEDRAFITA, D., ESTUNINGSIH, E., PLEASANCE, J., PROWSE, R., RAADSMA, H.W., MEEUSEN, E.N. & SPITHILL, T.W., 2007. Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity *in vitro* against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infection and Immunity*, **75** (4): 1954-1963.
- PILE, E., LESSA, S.S., SCHERER, P.O., SANTOS, J.A.A. & VASCONCELOS, M.C., 1999. Ocorrência de fasciolose bovina em Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Parasitologia Al Dia*, **23** (1): 123-124.
- PILE, E. & SEMEDO, C., 2006. Fascioliasis prevalence in Cape Verde. *Revista de Estudos Cabo-Verdianos*, **1** (3-4): 121-122.
- PILE, E.A., AHID, S.M.M. & SILVA, D.N.S., 2008. Variação mensal da fasciolíase entre pacientes com distúrbios gastro-hepáticos em Santiago, Cabo Verde. *Biológico, São Paulo*, **70** (1): 15-18.
- PRICE, E.W., 1953. The fluke situation in American ruminants. *Journal of Parasitology*, **39** (2): 119-134.
- QUEIROZ V.S., 2005. Enzimoimunoensaio (ELISA), Imunoeletrotransferência (EITB) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), como ferramentas para diagnóstico de Fasciolose hepática em bubalinos (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). Tese de Doutorado,

- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 96 pp.
- REY, L., 2008. *Parasitologia* (4ª Edição), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 500 pp.
- REZENDE, H.E.B., 1979. Retrospectiva da Fasciolose Bovina no Brasil. In: Seminário Nacional sobre Parasitoses de bovinos. Campo Grande, MTS. *Anais... EMBRAPA/CNPGC*, 133-143.
- RIM, H.J., FARAG, H.F., SORNMANI, S. & CROSS, J.H., 1994. Food-borne trematodes: ignored or emerging? *Parasitology Today*, **10**: 207-209.
- ROBERTS, J.A., WIDJAYANTI, S. & ESTUNINGSIH, E., 1996. Acquired resistance of merino sheep against *Fasciola gigantica*. *Parasitology Research*, **82** (8): 743-746.
- ROKNI, M.B., MASSOUD, J., O'NEILL, S.M., PARKINSON, M. & DALTON, J.P., 2002. Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, **44** (2): 175-179.
- ROKNI, M.B., MASSOUD, J. & HANILA, A., 2003. Comparasion of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* and their use in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Acta Tropica*, **88** (1): 69-75.
- ROSA, F.H.J., 2002. Esquistossomose por *Shistosoma bovis* (Sonsino, 1876) na Ilha de Santiago, Cabo Verde, aspectos de epidemiologia e de etiopatogenia. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 355 pp.
- ROSA, F.H.J., SIMÕES, M. & FERREIRA, M.L., 2002. Epidemiological aspects of bovine fasciolosis on the Island of Santiago (Cape Verde). Preliminary data. *Garcia de Orta Série de Zoologia*, **24** (1-2): 61-66.
- ROSSIGNOL, J.F., ABAZA, H. & FRIEDMAN, H., 1998. Successful treatment of human fascioliasis with nitazoxanide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **92** (1): 103-104.
- SAMPAIO-SILVA, M.L., CORREIA DA COSTA, J.M., VIANA DA COSTA, A.M., PIRES, M.A., LOPES, S.A., CASTRO, A.M. & MONJOUR, L., 1996. Antigenic components of excretory-secretory products of adult *Fasciola hepatica* recognized in human infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **54** (2): 146-148.
- SANTIAGO, N. & HILLYER, G.V., 1988. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, **74** (5): 810-818.
- SAVIOLI, L., CHISTULO, L. & MONTRESOR, A., 1999. New opportunities for the control of fascioliasis. *Bulletin of the World Health Organization*, **77** (1): 300.
- SCOTT, P., PEARCE, A., CHEEVER, A.W., COFFMAN, R.L. & SHER, A., 1989. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunological Reviews*, **112**: 161-182.
- SEMEDO, C.M.A., 2006. Fasciolose no Concelho de São Domingos, Ilha de Santiago, Cabo Verde. Monografia para obtenção de grau de Licenciatura em Biologia, Instituto Superior de Educação, Universidade de Cabo Verde, 46 pp.
- SEMYENOVA, S.K., MOROZOVA, E.V., CHRISANFOVA, G.G., GOROKHOV, V.V.,

- ARKHIPOV, I.A., MOSKVIN, A.S., MOVSESSYAN, S.O. & RYSKOV, A.P., 2006. Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* genes. *The Journal of Parasitology*, **92** (3): 525-530.
- SHIMALOV, V.V. & SHIMALOV, V.T., 2000. Findings of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, in wild animals in Bielorrussian Polesye. *Parasitology Research*, **86** (4): 342.
- SIRISRIRO, A., GRAMSD, R., VICHASRI-GRAMS, S., ARDSEUNGNEON, P., PANKAO, V., MEEPOOL, A., CHAITHIRAYANON, K., VIYANANT, V., TAN-ARIYA, P., UPATHAMB, E.S. & SOBHON, P., 2002. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, **105** (2): 119-129.
- SMITH, R.S., 1995. *Veterinary Clinical Epidemiology – A problem oriented approach* (2<sup>a</sup> Ed.), CRC press, London, 304 pp.
- SMITH, W.D., 1999. Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *International Journal for Parasitology*, **29** (1): 17-24.
- SOUSLBY, E.J., 1982. *Helminths, arthropods and domesticated animals* (7<sup>a</sup> Ed.), Bailliere, Tindall and Cassell, London, 40-52 pp.
- SPITHILL, T.W., PIEDRAFITA, D. & SMOOKER, P.M., 1997. Immunological approaches for the control of fasciolosis. *International Journal for Parasitology*, **27** (10): 1221-1235.
- SPITHILL, T.W. & DALTON, J.P., 1998. Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today*, **14** (6): 224-228.
- SPITHILL, T.W., SMOOKER, P.M. & COPEMAN, D.B., 1999a. *Fasciola gigantica*: Epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1<sup>a</sup> Ed), , CABI Publishing, Wallingford, UK, 465-526 pp.
- SPITHILL, T.W., SMOOKER, P.M., SEXTON, J.L., BOZAS, E., MORRISON, C.A., CREANEY, J. & PARSONS, J.C., 1999b. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1<sup>a</sup> Ed), CABI Publishing, Wallingford, UK, 377-410 pp.
- STRAUSS, W., O'NEILL, S.M., PARKINSON, M., ANGLES, R. & DALTON, J.P., 1999. Short report: Diagnosis of human fascioliasis: detection of anti-cathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **60** (5): 746-748.
- STUNKARD, H.W., 1957. Intraspecific variation in parasitic flatworms. *Systematic Zoology*, **6** (1): 7-18.
- TAIRA, N., YOSHIFUJI, H. & BORAY, J.C., 1997. Zoonotic potential of infection with *Fasciola* spp. by consumption of freshly prepared raw liver containing immature flukes. *International Journal for Parasitology*, **27** (7): 775-779.
- TALAIE, H., EMAMI, H., YADEGARINIA, D., NAVA-OCAMPO, A.A., MASSOUD, J., AZMOUDEH, M. & MAS-COMA, S., 2004. Randomized trial of a single, double and triple dose of 10 mg/kg of a human formulation of triclabendazole in patients with fascioliasis.

*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **31** (11): 777-782.

TAYLOR, E.L., 1965. La fascioliasis y el distoma hepático. *FAO Estud. Agr.*, **64**: 1-250.

TIMMRECK, T.C., 1994. *An introduction to epidemiology* (1ª Ed.), Jones and Bartlett Publishers, Boston, London, Singapore, 477 pp.

TORGERSON, P.R. & CLAXTON, J., 1999. Epidemiology and control. In: DALTON, J.P. *Fasciolosis* (1ªEd), CABI Publishing, Wallingford, UK, 113-150 pp.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, A.M. & JENNINGS, F.W., 2001. *Parasitologia veterinária* (2ª Ed.), Acribia, Barcelona, 129 pp.

VALERO, M.A., MARCOS, M.D., FONS, R. & MAS-COMA, S., 1998. *Fasciola hepatica* development in experimentally infected black rat, *Rattus rattus*. *Parasitology Research*, **84** (3): 188-194.

VALERO, M.A. & MAS-COMA, S., 2000. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian Altiplano high human endemic region. *Folia Parasitologia*, **47** (1): 17-22.

VALERO, M.A., VAREA, M.T. & MARIN, R., 2000. *Fasciola hepatica*: lithogenic capacity in experimentally infested rats and chemical determination of the main stone components. *Parasitology Research*, **86** (7): 558-562.

VALERO, M.A., DARCE, N.A., PANOVA, M. & MAS-COMA, S., 2001a. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology*, **102** (1-2): 85-100.

VALERO, M.A., PANOVA, M. & MAS-COMA, S., 2001b. Developmental differences in the uterus of *Fasciola hepatica* between livestock liver fluke populations from Bolivian highland and European lowlands. *Parasitology Research*, **87** (4): 337-342.

VALERO, M.A., PANOVA, M., COMES, A.M., FONS, R. & MAS-COMA, S., 2002. Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *The Journal of Parasitology*, **88** (2): 308-313.

VALERO, M.A., SANTANA, M., MORALES, M., HERNANDEZ, J.L. & MAS-COMA, S., 2003. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of fascioliasis: an experimental study in a rat model. *The Journal of Infectious Diseases*, **188** (5): 787-793.

VALERO, M.A., UBEIRA, F.M., KHOUBBANE, M., ARTIGAS, P., MUIÑO, L., MEZO, M., PÉREZ-CRESPO, I., PERIAGO, M.V. & MAS-COMA, S., 2009. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Veterinary Parasitology*, **159** (1): 77-81.

VERONESI, R., 1985. *Doenças infecciosas e parasitárias* (7ª Ed.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1209 pp.

VIGNAU, M.L., VENTURINI, L.M., ROMERO J.R., EIRAS, D.F. & BASSO, W.U., 2005. *Parasitología Práctica Y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos* (1ª Ed.), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires,

Argentina, 194 pp.

- VOLLER, A., 1976. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **70** (2): 98-106.
- WALKER, S.M., MAKUNDI, A.E., NAMUBA, F.V., KASSUKU, A.A., KEYYU, J., HOEY, E.M., PRÖDOHL, P., STOTHARD, J.R. & TRUDGETT, A., 2008. The distribution of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* within southern Tanzania-constraints associated with the intermediate host. *Parasitology*, **135** (4): 495-503.
- WATPAN, C.T., MALEEWONG, W., WONGKHAM, C., WONGKHAM, S., INTAPAN, P.M. & NAKASHIMA, K., 2005. Serodiagnosis of human fascioliasis by cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Fasciola gigantica* capthespsin L antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **72** (1): 82-86.
- WHO, 1995. Control of foodborne trematode infections. Report of a WHO study group. *WHO Tech. Rep. Ser.*, **849**: 1-157.
- WHO, 2007. Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. *WHO/CDS/NTD/PCT*, **1**: 33.
- YOKANANTH, S., GHOSH, S., GUPTA, S.C., SURESH, M.G. & SARAVANAN, D., 2005. Characterization of specific and cross-reacting antigens of *Fasciola gigantica* by immunoblotting. *Parasitology Research*, **97** (1): 41-48.
- ZHANG, W.Y., MOREAU, E., HOPE, J.C., HOWARD, C.J., HUANG, W.Y. & CHAUVIN, A., 2005. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. *Experimental Parasitology*, **111** (3): 154-159.
- ZUBIETA, R.C., 2003. Utilizacion de coproantigenos y coproanticuerpos en helmintologia. [http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/conf\\_raquel.htm](http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/conf_raquel.htm)>, Acesso em Agosto.

## **SITES DA INTERNET**

<http://www.fumouze.com/erreurappli.htm?aspxerrorpath=/productressources.aspx>

<http://www.google.pt/imgres?imgurl>

[http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/conf\\_raquel.htm](http://www.inta.gov.ar/producto/helminto/conf_raquel.htm)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> (The NCBI Taxonomy Homepage)

# ANEXOS

---





---

**Anexo 1: Preparação de antígeno total de *F. gigantea***

---

---

**Materiais**

---

- Solução salina de cloreto de sódio a 1‰
- Soro fisiológico 0,85%
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de centrífuga
- Almofariz
- Mixer
- Sonicador
- Centrífuga refrigerada
- Frigorífico

---

**Método**

---

1. Os parasitas adultos de *F. gigantea* são lavados várias vezes em soro fisiológico estéril frio até ficarem livres de impurezas, após isso, são lavado, uma vez, em solução salina 1‰ estéril;
2. Os vermes são triturados com solução salina 1‰ estéril;
3. Coloca-se a mistura em um almofariz de porcelana, devidamente esterilizado, põem-se no congelador a -20°C, congela-se e descongela-se por 3 vezes sucessivos com maceração, a fim de rebentar as células libertando as proteínas antigénicas;
4. Centrifuga-se a 5000 rotações por 45 minutos. Retira-se cuidadosamente o sobrenadante, que deverá estar límpido. O resíduo deve ser reservado para a preparação de antígenos deslipidizados;
5. O sobrenadante assim obtido constitui o antígeno solúvel;
6. Determina-se a concentração de proteína e testa-se o antígeno.

---

**Anexo 2: Preparação de antígeno deslipidizado de *F. gigantea***

---

---

**Materiais**

---

- Solução salina de cloreto de sódio a 1‰
- Álcool absoluto
- Éter etílico anidro
- Pipetas de Pasteur
- Tubos de centrífuga
- Dissecador
- Arca frigorífica
- Centrífuga refrigerada

---

**Método**

---

1. Submeter o resíduo obtido na preparação do antígeno total, a duas lavagens com álcool etílico absoluto e uma com éter etílico anidro congelados;
2. Colocar o resíduo numa placa de Petri adequada à quantidade obtida, e colocar num dissecador à 4°C até que a massa esteja completamente seca – cerca de 4 dias;
3. Pesar o resíduo obtido e colocar na proporção de 200 mg/ 10 ml de solução salina a 1‰ estéril e colocar a 4°C no frigorífico;
4. Agitar manualmente 3 vezes ao dia durante 3 dias;
5. Centrifugar a 4°C durante 45 minutos a 5000 rotações por minutos em centrífuga refrigerada;
6. Retirar cuidadosamente o sobrenadante;
7. O sobrenadante assim obtido constitui o antígeno deslipidizado;
8. Determinar a concentração de proteína e testar o antígeno.

**Anexo 3: Determinação quantitativa de proteínas (Método Bio-Rad Protein Assay)**

---

**Materiais**

---

- Reagente corante concentrado 5 vezes (Ácido fosfórico e metanol)
- Padrão de proteína
- Tubos de ensaio
- Micro pipetas
- Espectofotômetro
- Vortex

---

**Método (Macro método para 20 – 140 µg ou 200 – 1400 µg de proteína por ml)**

---

1. Preparar várias diluições de proteína;
2. Colocar 0,1 ml dos padrões e das amostras (previamente diluídas) em tubos de teste limpos e secos;
3. Colocar 0,1 ml do tampão da amostra no tubo de teste para o branco;
4. Juntar 5,0 µl do reagente corante diluído em cada tubo;
5. Agitar no vortex (evitar a formação de espuma em excesso);
6. Esperar entre 5 a 60 minutos e fazer a leitura no espectofotômetro a 595 nm após ter zerado o aparelho com o branco;
7. Fazer a curva de calibração com as densidades ópticas obtidas e as respectivas concentrações;
8. Fazer a leitura das amostras desconhecidas na curva padrão.

---

**Reagentes (preparados segundo o protocolo do kit da Bio-Rad)**

---

1. Diluir o reagente corante (previamente filtrado) na proporção de 1/5 em água desmineralizada;
2. Preparar a diluição seriada da proteína padrão;

**Anexo 4: Técnica de Micro-ELISA e preparação dos tampões para a execução da técnica****Preparação dos tampões para a técnica****1. Tampão carbonato pH 9.6**

|                                  |                                   |          |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------|
| NaHCO <sub>3</sub> (2,1 gr)..... | 500 ml (água destilada) (pH 8.0)  | } pH 9.6 |
| NaCO <sub>3</sub> (2,65 gr)..... | 500 ml (água destilada) (pH 11.2) |          |

**2. Soro fisiológico 9‰**

NaCl..... 9 gr

H<sub>2</sub>O destilada..... 1000 ml (1 litro)

**3. Tampão Fosfato 0,5 M pH 7.2**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anidro)..... 25,55 gr

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anidro)..... 9,65 gr

H<sub>2</sub>O destilada..... 500 ml

**4. Tampão PBS 0,01 M**

Tampão fosfato 0,5 M..... 20 ml

Soro fisiológico q.s.p..... 1000 ml

**5. Tampão PBS com TWEEN (concentração: 0,05%)**

Tampão PBS 0,01 M.....1000 ml

Tween.....0,5 ml

NOTA<sub>1</sub>: Para cada litro de PBS, utiliza-se 0,5 ml de Tween

NOTA<sub>2</sub>: 1 litro de PBS/Tween dá para 2 placas

**6. Tampão substrato/citrato pH-5.5**

Tampão PBS 0,1 M..... 400 ml

Tampão citrato..... 100 ml

Acertar pH com ácido cítrico

**\* Tampão PBS 0,1 M**

Tampão fosfato 0,5 M..... 100 ml

Soro fisiológico..... 400 ml

\* Tampão Citrato

Ácido cítrico 0,1 M..... 4,2 gr

H<sub>2</sub>O destilada..... 200 ml

## 7. Substrato Cromogénico

Ortofenildiamina..... 9 mg

Tampão substrato..... 25 ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30v/v.....25 µl

---

## Método

---

### 1. Sensibilização das placas com os antígenos em estudo (2 µl AgTs e 4 µl AgDs)

Ag (reconstituído).....50 µl

Tampão PBS 0.01 M (utilizamos Tampão carbonato).....10 ml (para cada placa)

1.1. Ag + PBS → 100 µl/poço

1.2. Placa na estufa a 37°C durante 30 min ou placa à temperatura ambiente durante 3h

1.3. Colocar a placa no frigorífico uma noite a 4°C.

### 2. Retirar as placas do frigorífico, eliminar o tampão e proceder às lavagens com PBS/Tween

2.1. Quatro lavagens

2.2. Aplicar 200 µl de PBS/Tween

- Aguardar 5 min

- Retirar o tampão, bater a placa sobre papel de filtro e reencher até 4ª lavagem

- Bloquear as placas com albumina bovina a 2%

- Incubar 1 hora e meia à temperatura ambiente

- Fazer quatro lavagens com PBS/Tween

### 3. Preparação da diluição dos soros

3.1. Soros em estudo: diluição de 1/200 (para IgM) e 1/400 (para IgG)

10 µl (soro)..... 4 ml (tampão PBS/Tween)

# 5 µl (soro)..... 2 ml (tampão PBS/Tween)

*# Preferencialmente este volume*

### 3.2. Placa

2 B (branco)..... 100 µl (tampão PBS/Tween)

6 N (soros normais)..... 100 µl

2 CT (controlo +)..... 100 µl

Soros em estudo..... 100 µl

3.3. Cobrir a placa com alumínio, deixar 2 h à temperatura ambiente e colocar uma noite a 4°C.

### 4. Lavagens como em 2.1

**5. Preparação das imunoglobulinas nas diluições de 1/40 000 (globulina marcada com peroxidase IgG anti-humano) e 1/50 000 (globulina marcada com peroxidase IgM anti-humano)**

5.1. Para cada placa coloca-se 10 ml:

1 µl..... 40 ml de PBS/Tween

1 µl..... 50 ml de PBS/Tween

5.2. Colocar 100 µl/poço e deixar 1:30h à temperatura ambiente

### 6. Lavagens 4 x (como em 2.1)

**7. Colocar 100 µl do substrato/poço. Cobrir a placa e deixar à temperatura ambiente, no escuro, durante 30 min.**

### 8. Parar a reacção com HCL 2N: 50 µl/poço

HCL 2N: HCl (37%)..... 19,6 ml

H<sub>2</sub>O destilada q.s.p..... 100 ml

### 9. Leitura no espectrofotómetro a 492 nm

**10. Cálculos (Cut-off)**

Somar os soros normais

Calcular a média X

Calcular o desvio padrão SD

$$XP = (2 \times SD) + X$$

Valores  $\geq XP$  = soro positivo

**11. Esquema da placa**

|   |  |  | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--|--|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
|   |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H |  |  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |



**Anexo 5: SDS-PAGE – Separação Electroforética****Reagentes**

- 30% Acrylamide Bis Solution (BIO-RAD)
- Tris HCl 1,5M (pH 8,8) (SIGMA<sup>®</sup>)
- Tris HCl 0,5M (pH 6,8) (SIGMA<sup>®</sup>)
- Trizma<sup>®</sup> base (SIGMA<sup>®</sup>)
- SDS 10% (w/v) (BIO-RAD)
- H<sub>2</sub>O destilada
- APS (Persulfato de amónio) 10% (BIO-RAD)
- TEMED (BIO-RAD)
- Glycine (BIO-RAD)
- 2-Mercaptoetanol (BIO-RAD)
- Precision Plus Protein<sup>®</sup> Standards (marcador de pesos moleculares – BIO-RAD)
- Azul de Bromofenol (Bromophenol blue) (SIGMA<sup>®</sup>)
- Azul de Coomassie R 250 (Brilliant blue R) (SIGMA<sup>®</sup>)

**Procedimento**

1. Montar o equipamento de electroforese de acordo com as recomendações da marca do mesmo.

Neste estudo, as tinas de electroforese utilizadas foram: modelo SE 250 Amersham Biosciences.

2. Preparação do Gel de Separação a 15%, conforme se segue:

| <b>Soluções</b>                                    | <b>Volume</b> |
|--|---------------|
| Acrylamide solution                                | 10 ml         |
| 4x Resolving gel buffer                            | 5 ml          |
| 10% SDS  | 200 µl        |
| ddH <sub>2</sub> O                                 | 4,7 ml        |
| Submeter a vácuo durante cerca de 15 minutos       |               |
| Ammonium persulphate* (APS) (solução extemporânea) | 100 µl        |
| TEMED*   | 6,7 µl        |

\* Estes reagentes são adicionados imediatamente antes da utilização do gel

3. Colocar a solução com uma seringa ou pipeta, imediatamente, a seguir à preparação da solução,

nas cassetes molde do gel, até 1 cm abaixo do nível do pente.

4. Cobrir o gel com propanol ou H<sub>2</sub>O destilada, para evitar o contacto do gel com o ar ambiente.
5. Deixar polimerizar durante 45 a 60 minutos à temperatura ambiente.
6. Preparação do Gel de Concentração a 4%, como se segue:

| Soluções  | Volume   |
|---|----------|
| Acrylamide solution                                 | 0,88 ml  |
| 4x Stacking gel buffer                              | 1,66 ml  |
| 10% SDS   | 66 µl    |
| ddH <sub>2</sub> O                                  | 44,06 ml |
| Submeter a vácuo durante cerca de 15 minutos        |          |
| Ammonium persulphate* (APS) (solução extemporânea ) | 33,4 µl  |
| TEMED*  | 3,3 µl   |

\* Estes reagentes são adicionados imediatamente antes da utilização do gel

7. Extrair o propanol ou H<sub>2</sub>O destilada, da superfície do gel de separação. Colocar os pentes (pente de posse único ou de 10 amostras), introduzindo de imediato o gel, lentamente, para evitar a formação de bolhas e ar. Após a colocação do gel, baixar o pente (inicialmente colocado com uma inclinação de 10%) até à posição horizontal.
8. Deixar polimerizar durante 45 a 60 minutos à temperatura ambiente.
9. Durante a polimerização do gel, preparar o tampão de amostra.
10. As amostras foram diluídas na solução tampão de amostra na proporção de 1:1, sendo depois levadas à banho-maria a 95°C durante 5 minutos.
11. Montar as duas cassetes com os 2 géis nos suportes de electroforese e colocá-los na tina “mini-SE 250 Amersham Biosciences”. Preencher com o tampão de corrida o espaço interior da cassette, até ao limite superior dos vidros do gel; o restante tampão é colocado na tina de modo a cobrir os eléctrodos.
12. De acordo com o pente utilizado (pente cego ou de 10 poços), distribuir as amostras e o marcador de peso molecular por cada poço, nos volumes de 20 µl e 10 µl, respectivamente. Se se usar um poço único, o volume de amostra a colocar no gel deverá ser 160 µl.
13. Ligar a tina à fonte de alimentação com uma voltagem de 120 V e intensidade de corrente de

400 mA, durante cerca de 1h e 30 minutos.

14. Após a electroforese, desmontar cuidadosamente, o sistema tendo o cuidado de identificar cada um dos géis.
15. Nesta fase os géis ou são transferidos para uma membrana de Nitrocelulose (ver mais adiante), ou são sujeitos a coloração pelo azul de Comassie ou pelo nitrato de prata.

---

### **Transferência para Membrana de Nitrocelulose (NC)**

---

1. Colocar o tampão de transferência num recipiente e molhar as esponjas, 2 folhas de papel de filtro (Whatmann 3 mm) e 1 folha de NC.
2. Colocar a esponja sobre a parte branca da cassette, seguindo-se 1 folha de papel de filtro, depois a NC/gel e finalmente a outra folha de papel de filtro.
3. Retirar com cuidado o gel das placas, retirando os separadores quase totalmente, fazendo pressão para levantar a placa de vidro de modo a que o gel permaneça na outra placa. Cobrir o gel com NC já humedecida (com H<sub>2</sub>O destilada), virar o gel/NC sobre a mão e retirar a placa (se for necessário juntar um pouco de tampão de transferência para que a placa deslize mais facilmente).
4. Colocar a NC/gel sobre uma folha de papel de filtro (Whatmann 3 mm) humedecida e cobrir com outra folha de papel de filtro. Pressionar rolando uma pipeta a toda a dimensão de gel, exercendo uma pressão contínua para retirar as bolhas de ar.
5. Introduzir a cassette na tina de transferência que já deve conter o tampão de transferência; a cassette deve ser orientada de modo que a face preta esteja voltada para a parte preta da tina.
6. A transferência deve ser feita durante 1 h e 40 minutos a 100 V e a uma temperatura de 23°C.
7. Após a transferência, deve-se marcar na NC a lápis as extremidades correspondentes às margens do gel, cortar o padrão e corar com azul de comassie (para os padrões moleculares que não são corados).
8. Colocar a outra parte da NC em solução de saturação: 5% de leite/PBS durante 2 horas à

temperatura ambiente e sob agitação constante ou 1 noite a 4°C. Secar entre duas folhas de papel de filtro, prepara para o blotting ou acondicioná-la entre o papel de filtro e envolver com folha de alumínio, etiquetar e guardar a -20°C para efectuar posteriormente o blotting.

**Nota:** A confirmação da qualidade da transferência, passa pelo aparecimento das bandas do padrão de pesos moleculares.

---

### Preparação das soluções e dos tampões para e execução da técnica

---

#### Tampão de Corrida

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Trizma® base                      | 6,0 g   |
| Glicina                           | 28,8 g  |
| SDS 10% (w/v)                     | 2,0 g   |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. | 2000 ml |

#### Tampão de amostra

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Tris HCl 0,5M (pH 6,8)     | 1,2 ml |
| SDS 10% (w/v)              | 2 ml   |
| Glicerol                   | 1,0 ml |
| Azul de Bromofenol         | 0,5 ml |
| H <sub>2</sub> O destilada | 4,8 ml |

#### Acrylamide solution

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| Acrylamide (FW 71,08) 30%      | 60 g        |
| Bisacrylamide (FW 154,17) 0,8% | 1,6 g       |
| H <sub>2</sub> O destilada     | para 200 ml |

#### 4x Resolving gel buffer (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8; 200 ml)

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Tris (FW 121,1) 1,5M       | 36,3 g      |
| H <sub>2</sub> O destilada | 150 ml      |
| HCl                        | para pH 8,8 |
| H <sub>2</sub> O destilada | para 200 ml |

#### 4x Stacking gel buffer (0,5M Tris-Cl, pH 6,8; 50 ml)

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Tis (FW 121,1) 0,5M        | 3,0 g       |
| H <sub>2</sub> O destilada | 40 ml       |
| HCl                        | para pH 6,8 |
| H <sub>2</sub> O destilada | para 50 ml  |

#### SDS 10%

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| SDS (FW 288,38) 10%        | 10 g        |
| H <sub>2</sub> O destilada | para 100 ml |

**10% Ammonium persulphate – APS**

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| Ammomium persulphate (FW 228,2) 10% | 0,1 g       |
| H <sub>2</sub> O destilada          | para 1,0 ml |

**Tampão de transferência (para 1 litro)**

|                                   |          |
|-----------------------------------|----------|
| Trizma <sup>®</sup> base          | 3,0,25 g |
| Glicina                           | 14, 41 g |
| Adicionar Metanol (20%)           | 200 ml   |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. | 1000 ml  |

**Corante (Azul de Comassie)**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| 0,1% de Azul de Comassie (w/v)    | 0,1 g  |
| 40% de metanol (v/v)              | 40 ml  |
| 10% de ácido acético (v/v)        | 10 ml  |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. | 100 ml |

*Nota: filtrar a solução depois de completa a dissolução de comassie. Guardar após usar à temperatura ambiente; a solução é reutilizável.*

**Descorante do azul de comassie**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| 40% de metanol                    | 40 ml  |
| 10% de ácido acético              | 10 ml  |
| H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. | 100 ml |

**Anexo 6: Immunoblotting**

---

**Procedimento**

---

**Preparação do acetato de nitrocelulose:**

Cortar a nitrocelulose com bisturi em tiras finas com comprimento = 2 mm de modo a caberem nas ranhuras da calha (o número de tiras correspondente às ranhuras existentes). Para cortar o acetato, deve-se utilizar uma régua limpa com álcool, pôr em posição vertical sobre o acetato (este deve estar em cima de papel de alumínio e sobre superfície lisa).

Usar uma pinça de plástico (sem ranhuras) para pegar nas tiras. Pegar sempre pelo lado do gel de concentração.

**Preparação dos soros:**

Colocar os soros na diluição de 1:100 (ou outra diluição, depende do estudo), em PBS/leite a 5% (5 g de leite magro e desnatado q.s.p. 100 ml) (deve-se colocar 1 ml em cada calha). Incubar 1 a 3 h à temperatura ambiente e uma noite a 4°C sempre com agitação.

*Nota: Anotar os soros e as respectivas calhas.*

**Lavagem:**

Aspirar o leite com o soro e fazer uma lavagem previa com PBS/Tween.

Lavar 3 x em PBS/Tween sob constante agitação durante 5 minutos, cada lavagem.

**Conjugado:**

Colocar o conjugado, diluído em PBS/leite (diluição 1:500 a 1:10 000). Deixar 2 horas à temperatura ambiente sob agitação.

**Lavagem:**

Lavagem como em 3 e mais uma lavagem com PBS sem Tween.

**Substrato:**

- Colocar o volume de metanol a utilizar à temperatura de -20°C (na arca congeladora);
- Pesar e dissolver o substrato 4CN (4-Chloro-1-Naphthol), que está a -20°C, no metanol;
  - Metanol ..... 5 ml
  - 4CN ..... 15 mg
- Preparar o substrato no seguinte volume e ordem:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| PBS sem Tween .....                 | 20 ml |
| 4CN em metanol .....                | 5 ml  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 25 µl |

**Reacção com o substrato:**

Colocar o substrato sobre as tiras e estar com atenção ao aparecimento de bandas; quando as tiras começarem a escurecer parar a reacção com H<sub>2</sub>O destilada (de preferência ter um frasco de esguicho com H<sub>2</sub>O destilada à mão).

Depois da reacção ter terminado, lavar as tiras com H<sub>2</sub>O destilada por 2x.

**Secagem das tiras:**

Retirar as tiras e colocar entre duas folhas de papel de filtro para secarem, tendo o cuidado de as colocar por ordem idêntica à da calha.

Quando estiverem secas, colocar sobre uma folha A4 na qual se marcou previamente a lápis um traço na horizontal correspondente à zona de separação dos géis e na ordem estabelecida.

**Padrão:**

Para os padrões que não vêm corados, corar a tira do padrão durante 1 – 2 minutos, em azul de comassie e descorar. Caso as bandas não fiquem perceptíveis, voltar a pôr a tira no corante e proceder à descoloração até boa visualização das bandas.

